



**Universidad
Andrés Bello**

Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**Caracterización de la acuaporina PrucxmSIP1;2 de la subfamilia
SIP (*Small Intrinsic Protein*) y su rol en la respuesta fisiológica a
estrés por hipoxia radical en *Solanum lycopersicum* cv.**

MicroTom

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de
Magíster en Biotecnología.

Profesor tutor: Dra. Paula Pimentel

Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura

María Josefina Mujica Castiglioni

Santiago, Chile

2017



**Universidad
Andrés Bello**

Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**“Caracterización de la acuaporina PrucxmSIP1;2 de la subfamilia SIP
(*Small Intrinsic Protein*) y su rol en la respuesta fisiológica a estrés
por hipoxia radical en *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom”**

MARÍA JOSEFINA MUJICA CASTIGLIONI

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dra. Paula Pimentel, en el laboratorio de Fisiología del Estrés, Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura (CEAF), aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

Dra. Paula Pimentel
Director de Tesis

Dra. Francisca Blanco
Comisión de Tesis

Dr. Erwin Krauskopf
Comisión de Tesis

**Santiago, Chile
2017**

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo va dedicado a mi papá Mario Pablo Mujica, quien no está físicamente conmigo, pero vivió todo este proceso y vivirá para siempre en mi corazón.

Quiero agradecer de forma muy especial a mi mamá Lorena Castiglioni, por siempre apoyarme en todas mis decisiones, darme ánimo y consejos cada vez que lo necesite y por todo su esfuerzo, porque gracias a ella soy quien soy y he podido cumplir todas mis metas. A mis abuelos Aquiles Castiglioni, María Alicia Cornejo, María Elena del Real y María Angélica del Real por acompañarme en este proceso y por toda su ayuda, ya que sin ellos todo hubiera sido más difícil.

Por otra parte, quiero agradecer a TODOS mis compañeros de CEAF pero en especial a la Dra. Paula Pimentel por guiarme en todo mi proceso de tesis y enseñarme un mundo nuevo y apasionante, el de la Fisiología. Fue un proceso largo para las dos pero quiero agradecerle la confianza que tuvo en mí. También quiero agradecer a Catalina Álvarez por ayudarme con el proceso de la obtención de transgénicas que fue un proceso pedregoso pero por sus consejos se logró llegar a puerto. Al Dr. Jorge Pérez, agradecerle el tiempo que dedico en enseñarme el proceso de transformación transitoria en tabaco. Al Dr. Ariel Salvatierra por ayudarme con sus conocimientos a nivel molecular. Y al Dr. Guillermo Toro por entregarme una parte de sus grandes conocimientos en parámetros de intercambio gaseoso y estadística. Por último y no menos importante, a todos mis amigos de CEAF: Simón Solís, Verónica Guajardo, Michelle Morales, Patricio Mateluna y Raúl Orellana, los cuales me ayudaron siempre que lo necesité y agradecerles todas las conversaciones, risas, comidas y momentos compartidos.

También quiero agradecer a mi gran amiga Marce, por siempre estar en los momentos indicados y escucharme cada vez que lo necesite. A Walo por ser mi amigo de toda la vida, a Nabuco por siempre estar presente y a mis amigos que me hicieron conocer el mundo de las dos ruedas: Nico, Oso y Braulio. ¡Los quiero mucho a todos!

INDICE

Abreviaciones.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN	
Género <i>Prunus</i> spp. y su importancia en Chile.....	9
Los frutales de carozo en la Región de O'Higgins.....	9
Los portainjertos.....	10
Estrés por hipoxia radical.....	11
Respuesta de la planta frente a estrés por hipoxia radical.....	11
Acuaporinas.....	13
Acuaporinas y estrés abiótico.....	15
Acuaporinas y la subfamilia SIP.....	16
Antecedentes.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	
Material vegetal.....	20
Metodología objetivo 1	
1. Identificación de secuencias codificantes y promotoras de acuaporinas SIP.....	20
2. Análisis filogenético.....	21

3. Análisis de dominios estructurales.....	22
4. Análisis de región promotora.....	22

Metodología objetivo 2

1. Aislamiento de gen <i>PrucxmSIP1;2</i>	23
2. Clonación de gen <i>PrucxmSIP1;2</i> en vector de entrada.....	23
3. Recombinación de vectores.....	25
4. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con vector recombinante...	26
5. Transformación transitoria y localización subcelular en <i>Nicotiana benthamiana</i>	27

Metodología objetivo 3

1. Transformación estable de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. MicroTom.....	28
2. Extracción de ADN.....	29
3. Selección de plantas transgénicas.....	30
4. Extracción ARN total.....	30
5. Síntesis de ADN complementario.....	30
6. Análisis de expresión génica.....	30
7. Caracterización fenotípica de líneas transgénicas.....	31
8. Tratamiento de inundación para la generación de hipoxia radical.....	31
9. Caracterización fisiológica.....	32
Análisis estadístico.....	32

RESULTADOS

Resultados objetivo 1.....	33
Resultados objetivo 2.....	45

Resultados objetivo 3.....	47
DISCUSIÓN	
Caracterización bioinformática de acuaporinas de la subfamilia SIP.....	58
Localización subcelular de la acuaporina PrucxmSIP1;2 en <i>N. benthamiana</i>	63
Efecto de la sobreexpresión del gen <i>PrucxmSIP1;2</i> en <i>S. lycopersicum</i> cv. MicroTom sometido a estrés por hipoxia radical.....	65
CONCLUSIONES.....	69
PROYECCIONES.....	70
ANEXO 1.....	71
ANEXO 2.....	73
REFERENCIAS.....	74

INDICE TABLAS

Tabla 1: Partidores utilizados.....	25
Tabla 2: Longitud de onda de excitación y emisión de fluoróforos utilizados en co-infiltración.....	27
Tabla 3: Medios utilizados para cultivo <i>in vitro</i>	29
Tabla 4: Motivos NPA y filtro de selectividad ar/R de acuaporinas SIP.....	38
Tabla 5: Descripción de motivos de la región promotora.....	43
Tabla 6: Caracterización fenotípica de <i>S. lycopersicum</i> transformado con gen <i>PrucxmSIP1;2</i>	50
Tabla 7: Caracterización de frutos de <i>S. lycopersicum</i> sobreexpresantes del gen <i>PrucxmSIP1;2</i>	50
Tabla 8: Efecto de la expresión de <i>PrucxmSIP1;2</i> en la transpiración (E) y en concentración interna de CO ₂ (Ci).....	53

INDICE FIGURAS

Figura 1:	Esquema de subfamilias de acuaporinas.....	13
Figura 2:	Esquema de una acuaporina.....	14
Figura 3:	Esquema de vector de entrada pENTR/SD/D-TOPO.....	24
Figura 4:	Esquema de vectores utilizados.....	26
Figura 5:	Esquema de tratamientos de material vegetal.....	32
Figura 6:	Matriz de identidad de secuencias de la subfamilia SIP.....	34
Figura 7:	Alineamiento de secuencia aminoacídica de acuaporinas SIP.....	35
Figura 8:	Análisis filogenético de subfamilia SIP de diferentes especies.....	39
Figura 9:	Predicción de dominios estructurales.....	40
Figura 10:	Esquema de acuaporina <i>PrucxmSIP1;2</i>	42
Figura 11:	Esquema de motivos presentes en la región promotora.....	44
Figura 12:	Localización subcelular de <i>PrucxmSIP1;2</i> en tejido de <i>N. benthamiana</i>	46
Figura 13:	Muestras de ADN genómico de hojas de <i>S. lycopersicum</i>	47
Figura 14:	Muestras de ARN total de hojas de <i>S. lycopersicum</i>	48
Figura 15:	Expresión de <i>PrucxmSIP1;2</i> y <i>SISIP1;2</i> mediante qPCR.....	49
Figura 16:	Efecto de la expresión de <i>PrucxmSIP1;2</i> en (a) fotosíntesis neta (A) y (b) conductancia estomática (gs).....	52
Figura 17:	Cambios de la fotosíntesis neta (A) en función de la conductancia estomática (gs).....	54
Figura 18:	Efecto de la expresión de <i>PrucxmSIP1;2</i> en la eficiencia del uso del agua (EUA).....	55
Figura 19:	Estomas de plantas transformadas con el gen <i>PrucxmSIP1;2</i>	56
Figura 20:	Efecto de la expresión de <i>PrucxmSIP1;2</i> en la de densidad estomática...	57

Abreviaciones:

A	:	Tasa fotosíntesis neta
ADNc	:	ADN complementario
ar/R	:	región de constricción aromático/Arginina
ATP	:	Adenosín trifosfato
Ci	:	Concentración interna CO ₂
E	:	Transpiración
EUA	:	Eficiencia del uso del agua
GFP	:	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
gs	:	Conductancia estomática
HR	:	Humedad relativa
HYG	:	Higromicina
LB	:	Luria Bertani
MCC	:	Medio de co-cultivo
ME	:	Medio de elongación
MI	:	Medio de inducción
MIP	:	Proteínas intrínsecas de membrana
MR	:	Medio de enraizamiento
MS	:	Murashige y Skoog
NIP	:	Proteína intrínseca similar a Nodulin26 (<i>Nodulin26-like intrinsic protein</i>)
NPA	:	Motivo NPA (Asparagina-Prolina-Alanina)
PAR	:	Radiación Fotosintéticamente Activa
pb	:	Pares de bases
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PIP	:	Proteína intrínseca de membrana (<i>Plasma intrinsic protein</i>)
qPCR	:	PCR en tiempo real
SIP	:	Pequeña proteína intrínseca (<i>Small intrinsic protein</i>)
TIP	:	Proteína intrínseca de tonoplasto (<i>Tonoplast intrinsic protein</i>)
TM	:	Tempratura de fusion (<i>Melting temperature</i>)
WT	:	Planta silvestre (<i>Wild Type</i>)
XIP	:	Proteína intrínseca no caracterizada (<i>Uncharacterized intrinsic protein</i>)

RESUMEN

Un sistema radical bien oxigenado, es esencial para el desarrollo adecuado de las plantaciones de árboles frutales, sin embargo, problemas de mal drenaje en los suelos donde se encuentran estos cultivos, pueden producir condiciones de estrés por hipoxia radical. La identificación de los genes que participan en la respuesta de tolerancia al estrés por hipoxia radical, ayudará a entender con más detalle la respuesta de la planta frente a este estrés. Dentro de los genes candidatos, se encuentra la familia de las acuaporinas (PIP, TIP, NIP, SIP, XIP), las cuales han sido relacionadas con la tolerancia a variados tipos de estrés abiótico, como salinidad y estrés hídrico. Este estudio, estuvo enfocado en la caracterización de una acuaporina de la subfamilia SIP (*Small Basic intrinsic protein*) y su participación en la tolerancia al estrés por hipoxia radical. En análisis previos, se observó una inducción en los transcritos del gen *SIP1;2* por efecto del estrés por hipoxia en el genotipo tolerante, 'Mariana 2624' (*PruxcmSIP1;2*), y una disminución en la expresión en el genotipo sensible, 'Mazzard F12/1' (*PruavSIP1;2*).

El gen candidato, *PruxcmSIP1;2*, del genotipo tolerante fue caracterizado en profundidad. El análisis *in silico* de la región promotora del gen de interés, se pudo identificar la ausencia de un motivo relacionado con MeJa, el cual se encuentra presente en el genotipo sensible. El estudio de la localización subcelular en *N. benthamiana* reveló que la acuaporina *PruxcmSIP1;2* se encuentra en el retículo endoplasmático. Los resultados de la caracterización fisiológica en plantas de tomate cv. MicroTom que sobreexpresan ectópicamente el gen candidato, sugieren la participación de esta acuaporina en la tolerancia al estrés por hipoxia, debido a que las líneas transgénicas presentan un aumento en la fotosíntesis, en la conductancia estomática y por esto un aumento en la eficiencia del uso del agua. Son necesarios estudios posteriores que permitan conocer en profundidad el rol que cumple esta acuaporina en la tolerancia al estrés por hipoxia.

INTRODUCCIÓN

Género *Prunus* spp. y su importancia en Chile

El género *Prunus* spp. pertenece a la familia de las *Rosaceae*, familia que incluyen algunas de las especies más consumidas del mundo, tales como manzano, frutilla, frambuesa y peral. En dicho género podemos encontrar los frutales de carozo, tales como, duraznero [*P. persica* (L.) Batsch], damasco (*P. armeniaca* L.), cerezo (*P. avium* L.), almendro [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.], ciruelo europeo (*P. domestica* L.), ciruelo japonés (*P. salicina* L.) y sus respectivos híbridos (Potter *et al.*, 2007).

Chile es uno de los principales productores y exportadores de fruta a nivel mundial, siendo el mayor exportador del hemisferio sur. La exportación de fruta es un área de gran interés comercial y Chile presenta un destacado aumento en los últimos años, siendo el segundo rubro de mayor importancia económica para el país, con ingresos cercanos a US\$1.4 millones por exportación de uva de mesa y a US\$500.000 en el caso de cerezas y arándanos. Estos dos últimos han tenido un importante aumento en sus plantaciones en los últimos diez años. Además de las frutas antes mencionadas, Chile es uno de los principales exportadores de ciruelas, paltas, kiwis, duraznos y nectarines (FAO, 2006; ODEPA, 2016).

Los frutales de carozo en la Región de O'Higgins

Los frutales de carozo abarcan una superficie aproximada de 67.000 hectáreas, equivalente a un 25% de la superficie total de frutales plantada en el país, concentrándose principalmente en la zona central, desde la Región de Valparaíso hasta la Región del Maule (ODEPA, 2016). En la Región de O'Higgins, las cinco especies de frutales que presentan mayor superficie plantada son: uva de mesa (12.363 hectáreas), duraznero y nectarin (9.687 hectáreas), manzano (9.243 hectáreas), cerezo (8.674 hectáreas) y ciruelo (7.776 hectáreas), perteneciendo la mayoría de estos frutales al género *Prunus*

spp. y abarcando alrededor de 30.000 hectáreas, lo que representa el 50% de la superficie total plantada de frutales de carozo en Chile (ODEPA, 2016).

Las condiciones climáticas que posee la Región de O'Higgins permiten el cultivo de frutales de carozo, sin embargo, problemas de mal drenaje en suelos pesados o arcillosos pueden afectar su cultivo. Chile presenta más de 1 millón de hectáreas con este problema y en la región de O'Higgins existe una predominancia de suelos de texturas finas (arcillosos y franco arcillosos); estudios muestran que en la provincia de Colchagua el 64% de los suelos presentan algún tipo de problema de mal drenaje. En estos tipos de suelo, las abundantes lluvias o malas prácticas de riego, pueden llegar a producir anegamientos o diferencias en el contenido de oxígeno en los suelos (PROCISUR, 2010).

Los portainjertos

Las variedades de interés productivo (parte aérea) son injertadas sobre un portainjerto compatible (parte radical), el cual le otorga ciertas características que le permiten una mejor adaptación a múltiples estreses abióticos ocasionados por condiciones desfavorables de suelo como sequía, salinidad, acidez, entre otros y/o tolerancia a estreses bióticos como nemátodos, hongos y bacterias. Además, se ha observado que el portainjerto también puede favorecer a la variedad, regulando el inicio de floración, vigor y rendimiento productivo. También se ha descrito que puede modificar características del fruto como, tamaño, propiedades nutricionales y organolépticas (Jiménez *et al.*, 2007; Gainza *et al.*, 2015).

Las variedades del género *Prunus* spp. han sido catalogadas como sensibles frente a estrés por hipoxia radical, a diferencia de otras plantas leñosas que presentan una mayor tolerancia a este estrés (Pistelli *et al.*, 2012). A pesar de esto, en las especies pertenecientes al género *Prunus* spp. existe una gran variabilidad en la capacidad de tolerancia a hipoxia radical, por ejemplo, suelos anegados provocan la muerte de algunos portainjertos de cerezos y durazneros, mientras que los portainjertos de ciruelos

presentan una mayor tolerancia y pueden sobrevivir a largos periodos bajo este estrés (Pinochet, 2010; Pimentel *et al.*, 2014).

Estrés por hipoxia radical

El anegamiento puede llegar a generar una condición de deficiencia de oxígeno para las raíces de las plantas. Esto es debido a que el agua desplaza al aire que se encuentra en los poros del suelo, generando condiciones limitantes de oxígeno en las raíces de las plantas, este estrés abiótico se define como estrés por asfixia o hipoxia radical (Bailey-Serres y Voesenek, 2017).

En un ambiente aeróbico, la célula genera energía mediante la respiración mitocondrial comenzando con la metabolización de la glucosa, proceso denominado glicólisis, y finalizando con la fosforilación oxidativa (Dennis *et al.*, 2000). Se pueden identificar tres condiciones dependiendo de los niveles de oxígeno en los suelos: La normoxia ocurre cuando el suministro de O₂ no limita la fosforilación oxidativa, la hipoxia es cuando la concentración del oxígeno en el suelo se encuentra bajo el nivel óptimo y la anoxia se refiere a una completa falta de oxígeno, que generalmente ocurre en suelos después con periodos prolongados de anegamiento (Ellis y Setter, 1999). Este estrés genera, principalmente, una alteración en el status energético de la planta, debido al bloqueo de la cadena transportadora de electrones, disminuyendo la cantidad disponible de energía (ATP) para su funcionamiento (Dennis *et al.*, 2000).

Respuesta de la planta frente a estrés por hipoxia radical

Las plantas responden de manera diferencial frente a estrés por hipoxia radical, generando adaptaciones a nivel molecular, metabólico, fisiológico y morfo-anatómico (Pistelli *et al.*, 2012).

Una de las primeras respuestas que genera la planta a nivel metabólico, es la activación de la vía fermentativa del ácido láctico, como forma alternativa para la

obtención de ATP, debido a que la cadena transportadora de electrones es bloqueada. Esto conlleva a una acumulación de lactato en el citoplasma, el cual puede alterar el pH del medio celular. Al ocurrir una disminución del pH citoplasmático, se inhibe la metabolización del lactato y se activa la vía fermentativa del etanol, la cual se considera la principal vía de producción de energía en condiciones carentes de oxígeno, evitando que la disminución del pH sea perjudicial para el metabolismo de la planta (Kato-Noguchi y Morokuma, 2007; Bailey-Serres y Voesenek, 2017).

A nivel fisiológico la primera respuesta es el cierre estomático, esto ocurre debido a una disminución en el potencial hídrico de la planta, lo que disminuye la turgencia de las células adyacentes al poro estomático produciendo su cierre (Else *et al.*, 1996), esto limita la pérdida de agua a través de la transpiración (E) de las hojas y a su vez, conlleva a una disminución de la actividad fotosintética (A) y una baja en la asimilación de CO₂ (Bradford, 1983; Pérez-Jiménez *et al.*, 2017). Estudios realizados en un grupo de genotipos de portainjertos de manzano (*Malus* spp.), determinaron que al ser sometidos a estrés por hipoxia radical, el genotipo de mayor tolerancia no presenta una variación significativa en su actividad fotosintética y en su conductancia estomática, pero si se observó una disminución en la cantidad de estomas presentes (Bai *et al.*, 2013). Resultados similares se observó en un ensayo de anegamiento, en donde se comparan las respuestas de distintos portainjertos de *Prunus* spp. frente a estrés por hipoxia, en donde se determinó que el genotipo tolerante ('Mariana 2624') presenta la misma conductancia estomática y asimilación de CO₂ que las plantas control, en cambio en el genotipo con mayor sensibilidad a hipoxia radical ('Mazzard F12/1') los parámetros anteriormente mencionado disminuyen drásticamente después de 3 días de tratamiento (Pimentel *et al.*, 2014).

Otro parámetro importante, es la eficiencia del uso del agua (EUA) el cual está directamente relacionado con el tiempo de apertura estomática, ya que refleja el equilibrio entre los moles de CO₂ asimilado y los moles de agua transpirada. Una alta eficiencia del uso del agua, se considera una característica adaptativa importante para las especies en condiciones de sequía. Sin embargo, también puede ser importante cuando existen

limitaciones fisiológicas a la absorción de agua, tales como la disminución de la permeabilidad de la membrana en las raíces, causada por la deficiencia de oxígeno durante la inundación del suelo (McLeod *et al.*, 1986; Medrano *et al.*, 2009).

Acuaporinas

Las acuaporinas son proteínas de transmembrana, de un tamaño aproximado de 21-34 kDa, estas se encuentran clasificadas dentro de una familia muy conservada denominada proteínas intrínsecas de membrana (MIP) y se han caracterizado en animales, microorganismos y plantas (Ariani y Gepts, 2015; Cui *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2014; Wudick *et al.*, 2009). Las acuaporinas a su vez se pueden clasificar en plantas superiores dentro de diferentes subfamilias: *Plasma intrinsic protein* (PIP), *Tonoplast intrinsic protein* (TIP), *Nodulin26-like intrinsic protein* (NIP), *Small Basic intrinsic protein* (SIP) y *Uncharacterized intrinsic protein* (XIP) (Figura 1), éstas varían en su expresión génica dependiendo de la especie, órgano, etapa de desarrollo y condiciones ambientales (Chaumont y Tyerman, 2014; Johanson y Gustavsson, 2002).

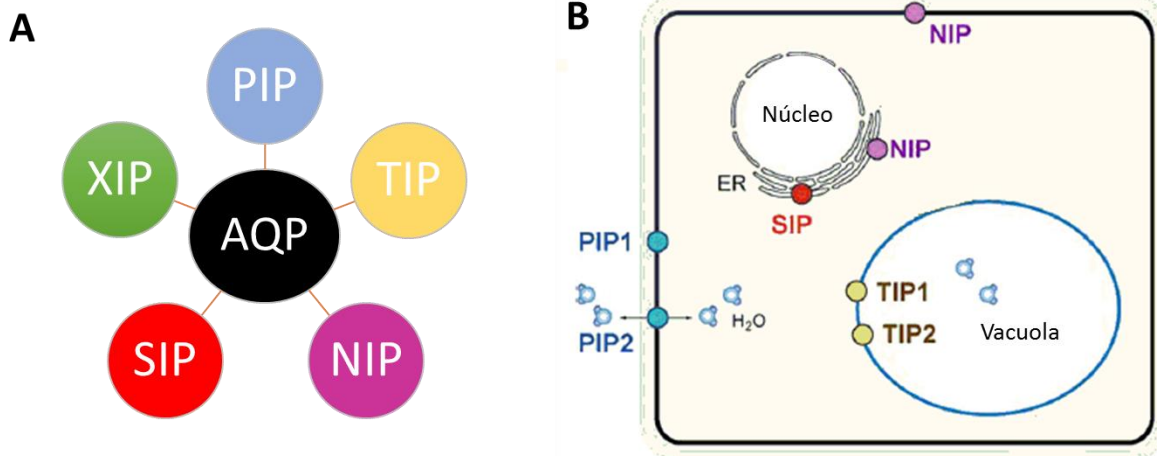


Figura 1. Esquema de las subfamilias de acuaporinas. (A) *Plasma intrinsic protein* (PIP), *Tonoplast intrinsic protein* (TIP), *Nodulin26-like intrinsic protein* (NIP), *Small Basic intrinsic protein* (SIP) y *Uncharacterized intrinsic protein* (XIP) (B) Ubicación de las subfamilias dentro de la célula (Modificación de Ishikawa, F. y Maeshima, M., 2007)

Se ha caracterizado el rol fundamental que cumple esta familia de proteínas en la célula, el cual está relacionado con el transporte pasivo de agua a través de la membrana celular, en dirección hacia el menor potencial hídrico, el cual va a depender de la presión osmótica e hidrostática a través de la membrana (Johansson *et al.*, 2000; Martínez-Ballesta *et al.*, 2011).

Los dominios proteicos presentes en las acuaporinas forman un poro en la membrana celular, el cual está compuesto por seis α -hélices hidrofóbicas (H1-H6) conectadas a través de cinco loops (LA-LE) (Figura 2), dichos dominios son altamente conservados en el reino animal y vegetal. Sus extremos amino y carboxilo terminal quedan expuestos hacia el citoplasma permitiendo su regulación mediante fosforilación, metilación, ubiquitinación y protonación, afectando el tránsito a través del poro (Chaumont y Tyerman, 2014; Maurel *et al.*, 2009). Estas proteínas, a su vez, se ensamblan como homo y/o heterotetrámeros en la membrana, pero cada monómero actúa como canal independiente (Chaumont y Tyerman, 2014; Fetter *et al.*, 2003).

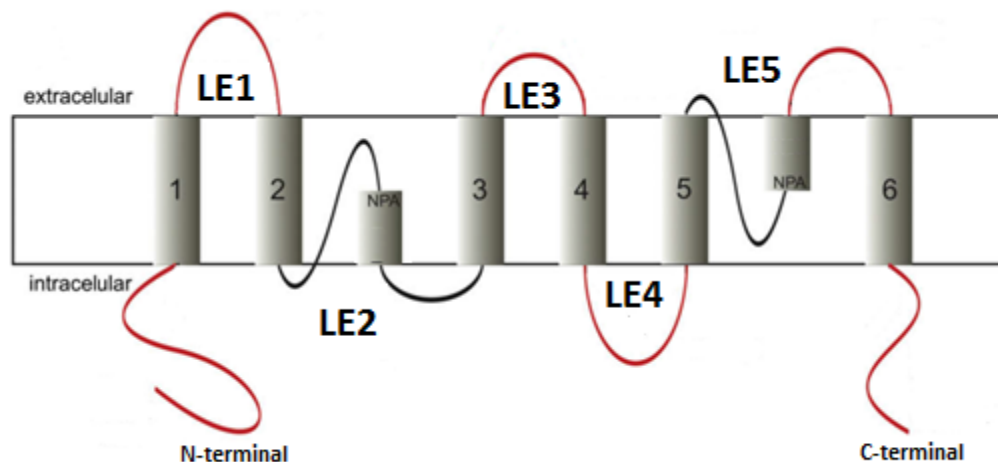


Figura 2. Esquema de una acuaporina. Extremos N-terminal y C-terminal se exponen hacia el medio citoplasmático de la membrana. Se observan seis alfa hélices (1-6), los cinco loops (LE₁-LE₅) y los motivos NPA (Modificado de Törnroth-Horsefield *et al.*, 2010)

Las acuaporinas tienen dos motivos característicos:

A) Motivos NPA: Motivos altamente conservados en algunas subfamilias, los cuales están compuestos por tres aminoácidos (Asparagina, Prolina y Alanina). Este motivo se encuentra ubicado en el loop B y en el loop E. Cuando la proteína se encuentra plegada estos motivos generan una barrera que obstruye el paso de protones a través de regulación electrostática (Wallace y Roberts, 2004).

B) Motivo o región de constricción aromático/Arginina (ar/R): Motivo compuesto por cuatro aminoácidos, el primero está ubicado en el dominio de transmembrana H2, el segundo aminoácido se encuentra en la región transmembrana H5 y los dos últimos en el loop E (LE₁ y LE₂), el aminoácido ubicado en H2 es aromático y el ubicado en LE₂ es una arginina, los otros dos aminoácidos son variables (Wallace y Roberts, 2004). Estos dos últimos aminoácidos pueden permitir que el poro sea sustrato específico, permitiendo el paso de solutos pequeños sin carga, tales como glicerol, urea, amonio, CO₂ y H₂O₂, y también ácido bórico, arsénico y ácido silico (Maurel *et al.*, 2009; Wudick *et al.*, 2009; Chaumont y Tyerman, 2014).

Acuaporinas y estrés abiótico

La mayoría de los estudios en acuaporinas se han enfocado en la caracterización de las subfamilias PIP y TIP, describiéndolas en distintas especies vegetales como *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Vitis vinifera*. Estos estudios han relacionado las posibles funciones de las acuaporinas en la planta frente a distintos estreses abióticos tales como: salinidad, estrés hídrico y toxicidad producida por boro (Maurel *et al.*, 2015; Martínez-Ballesta y Carvajal, 2014).

También se ha descrito, que las acuaporinas tienen una importante participación en la optimización de los parámetros de conductividad hidráulica (medida de permeabilidad) en las raíces durante situaciones de estrés, presentando una regulación en su expresión en dicho tejido. Frente a estrés por hipoxia radical, se ha observado que

las acuaporinas disminuyen el diámetro del poro y su abundancia en la membrana, controlado así el transporte pasivo de agua y disminuyendo la permeabilidad de las raíces durante el anegamiento (Martínez-Ballesta *et al.*, 2011; Chaumont y Tyerman, 2014;).

En un ensayo de cuatro semanas de estrés hídrico, en el cual se utilizaron líneas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan una acuaporina de *Vicia faba* (haba) (*VfPIP1*), se pudo observar que las plantas transgénicas mostraron un fenotipo similar al control y presentan una tasa de transpiración 21% menor que las plantas control, lo que sugiere que la expresión de *VfPIP1* disminuye la pérdida de agua a través de la transpiración (Cui *et al.*, 2008). También se ha descrito que al sobreexpresar, en *Arabidopsis thaliana*, la acuaporina de plátano *MaPIP1;1*, esta le confiere tolerancia a estrés hídrico y salinidad, disminuyendo el daño producido en la membrana plasmática de las células, logrando mantener el equilibrio osmótico (Xu *et al.*, 2014).

Dentro de la subfamilia de las acuaporinas TIP, se ha observado que al sobreexpresar la acuaporina de *Solanum lycopersicum* TIP2 (*SlTIP2*), de igual manera que en el estudio anterior, se generó una disminución en la transpiración bajo estrés hídrico, produciendo un balance entre el CO₂ asimilado, el agua y los nutrientes obtenidos (Martínez-Ballesta y Carvajal, 2014). También se ha observado, que la subfamilia TIP estaría involucrada en la reversión del daño producido por estrés hídrico en las hojas de *Populus trichocarpa*, las cuales presentan un alto grado de sensibilidad a este estrés, pero tienen una rápida recuperación en presencia de agua, esto estaría relacionado con el aumento significativo de la expresión de la acuaporina TIP (Laur y Hacke, 2014).

Acuaporinas y la subfamilia SIP

La subfamilia SIP fue clasificada como una nueva subfamilia de acuaporinas en el año 2002, en un estudio en el cual se descubrió que los integrantes de esta subfamilia presentaban un extremo N-terminal más corto en comparación al resto de las subfamilias de acuaporinas (Johanson y Gustavsson, 2002). La secuencia génica de las SIP tienen

aproximadamente 700 nucleótidos, cerca de 100 nucleótidos por debajo de las otras subfamilias (Ishikawa *et al.*, 2005).

Además, en un estudio de modelamiento por homología de secuencias de aminoácidos, se identificó que dentro del motivo NPA, el aminoácido alanina varía en las tres isoformas de SIP conocidas, siendo: treonina (NPT) en SIP1;1, cisteína (NPC) en SIP1;2 y leucina (NPL) en SIP2 (Ishikawa *et al.*, 2005; Noronha *et al.*, 2014; Ariani y Gepts, 2015). Esta variación ha permitido relacionar evolutivamente estas acuaporinas con las acuaporinas AQP11 y AQP12 de mamíferos, las cuales varían su motivo NPA a NPC y NPT respectivamente. Además, su extremo N-terminal es más corto que el N-terminal del resto de las acuaporinas, una característica que se ha asignado para explicar su localización subcelular (Maeshima y Ishikawa, 2008; Verma *et al.*, 2014).

El motivo ar/R de SIP1, posee aminoácidos de características muy similares a las TIP y NIP, pero en el caso de SIP2, que se expresa mayormente en raíz, presenta residuos más hidrofílicos que las otras isoformas, lo cual podría facilitar el transporte de ciertas moléculas como glicerol y agua (Wallace y Roberts, 2004).

Se ha determinado que las acuaporinas de la subfamilia SIP, se encuentran localizadas en la membrana del retículo endoplasmático (Ishikawa *et al.*, 2005; Noronha *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017) y también se ha observado en *Arabidopsis thaliana* que pueden ser órgano específicas; así se ha identificado que *AtSIP1;1* y *AtSIP1;2* se expresa en todos los tejidos pero *AtSIP2;1* se expresa principalmente en flores y raíces (Ishikawa *et al.*, 2005).

En estudios enfocados en medir la capacidad de permeabilidad al agua de las acuaporinas SIP en *Arabidopsis thaliana* expresándolas en células de levadura y probadas en soluciones hipotónicas mostraron que SIP1;1 y SIP1;2 mejoran la permeabilidad en un 170% y 200%, respectivamente, respecto a la levadura control, mientras que SIP2;1 no genera variaciones en este parámetro (Ishikawa *et al.*, 2005).

En un reciente estudio realizado en soya, determinaron que la sobreexpresión del gen *GmSIP1;3* en tabaco, le otorga tolerancia frente a estrés ocasionado por H₂O₂. Esto indica que *GmSIP1;3* juega un rol importante en el proceso antioxidante de la planta (Zhang *et al.*, 2017)

Antecedentes

En el Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura (CEAF) se evaluó la respuesta de siete portainjertos de frutales de carozo frente a estrés por hipoxia radical. En los resultados obtenidos, se pudo identificar genotipos con respuesta contrastante al estrés después de 14 días de tratamiento de anegamiento. El portainjerto 'Mariana 2624' (*Prunus cerasifera* x *Prunus munsoniana*) fue uno de los más tolerantes y 'Mazzard F12/1' (*Prunus avium*) uno de los portainjertos más sensible (Pimentel *et al.*, 2014). Junto con esto, se identificaron tres secuencias que codifican para acuaporinas SIP en el genoma de *Prunus persica*, estas son: Prupe.3G216100 (*SIP1;1*), Prupe.7G000900 (*SIP1;2*) y Prupe.7G020600 (*SIP2*). A partir de estas secuencias, se diseñaron partidores específicos para analizar los niveles de expresión de dichos genes mediante qPCR, en los dos portainjertos de *Prunus* spp. con una respuesta contrastante al estrés por hipoxia ('Mariana2624' y 'Mazzard F/12'). En estos análisis se observó que la expresión de uno de estos genes (*SIP1;2*), mostró un aumento en los niveles de transcrito en el genotipo tolerante en condición de estrés, mientras que en el genotipo sensible, la expresión disminuyó por efecto del estrés por hipoxia. Junto con esto, se analizó la expresión de estos tres genes en distintos órganos del genotipo tolerante y todos presentan una mayor expresión en raíces y flores (Ver sección Anexo).

De acuerdo a los antecedentes anteriormente mencionados y a los escasos estudios realizados en acuaporinas de la subfamilia SIP, es interesante estudiar la relación entre la expresión de estas acuaporinas y su posible participación en la tolerancia observada en el portainjerto 'Mariana 2624' (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*) frente a estrés por hipoxia, específicamente la acuaporina SIP homóloga a Prupe.7G000900 que en este estudio se reconocerá con el código *PrucxmSIP1;2*.

Entonces,

1. Las acuaporinas son moduladas en respuesta a distintos estreses abióticos.
2. Dentro del género *Prunus* spp. podemos encontrar un gradiente de tolerancia al estrés por hipoxia
3. El gen *PrucxmSIP1;2* muestra una expresión diferencial en raíces de los genotipos contrastantes en la respuesta al estrés por hipoxia.

Hipótesis

De acuerdo a los antecedentes anteriores, se plantea la siguiente hipótesis:

La sobreexpresión del gen *PrucxmSIP1;2* confiere una mayor tolerancia a hipoxia radical en *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom

Objetivo general

Evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen *PrucxmSIP1;2* en *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom sometido a hipoxia radical.

Objetivos específicos

1. Caracterizar bioinformáticamente las secuencias codificantes y promotoras de acuaporinas de la subfamilia SIP de los genotipos contrastantes a la hipoxia radical ‘Mariana 2624’ y ‘Mazzard F12/1’.
2. Determinar la localización subcelular de la acuaporina *PrucxmSIP1;2* en *Nicotiana benthamiana*.
3. Evaluar la tolerancia de *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom que sobreexpresa el gen *PrucxmSIP1;2* al estrés por hipoxia radical.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Para la generación de las líneas transgénicas que sobreexpresan el gen de interés, se utilizó la planta modelo *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom. Dichas líneas transgénicas se mantuvieron en cámara de crecimiento con condiciones controladas de temperatura, luz y humedad (25°C; 400-500 PAR; 50% HR).

Para la determinación de la localización subcelular del gen candidato, se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* de un mes de edad mantenidas bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento (25°C; 400-500 PAR; 50% HR).

Las plantas de *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom y *Nicotiana benthamiana* fueron fertilizadas cada siete y 15 días respectivamente, con 0,5g/L de un fertilizante comercial que contiene N:P:K (25:10:10) (Ultrasol™, Soquimich, Chile).

Metodología objetivo 1: Caracterizar bioinformáticamente las secuencias codificantes y promotoras de acuaporinas de la subfamilia SIP de los genotipos contrastantes a la hipoxia radical ‘Mariana 2624’ y ‘Mazzard F12/1’.

1. Identificación de secuencias codificantes y promotoras de acuaporinas SIP

Para la identificación de las secuencias promotoras y codificantes de los genes de interés, se utilizaron las secuencias homólogas que codifican para acuaporinas de la subfamilia SIP, estas fueron identificadas en el genoma del duraznero v2.1, obtenidas desde la base de datos Phytozome v11 (<http://www.phytozome.org>). Las secuencias promotoras y las secuencias codificantes de las acuaporinas SIP de ‘Mariana 2624’ (*Prunus cerasifera* Ehrh x *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick) y ‘Mazzard F12/1’ (*Prunus avium* L.) fueron adquiridas de la resecuenciación del genoma de ambos genotipos mediante ION Proton™ (Life Technologies, Carlsbad, CA), realizado en la tesis de magister de Simón

Solís, enmarcada en el proyecto FONDECYT 1121117 y visualizado mediante el software IGV (Integrative Genome Visualization; <http://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

2. Análisis filogenético

Para el análisis filogenético de la familia de acuaporinas SIP, se utilizaron las secuencias aminoacídicas deducidas de los genes miembros de la subfamilia SIP pertenecientes a las siguientes especies: *Arabidopsis thaliana*, *Carica papaya*, *Citrus sinensis*, *Fragaria vesca*, *Hordeum vulgare*, *Malus domestica*, *Medicago truncatula*, *Musa acuminata*, *Populus trichocarpa*, *Prunus persica*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera*, *Zea mays* y de los portainjertos en estudio ‘Mariana 2624’ (*Prunus cerasifera* Ehrh x *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick), ‘Mazzard F12/1’ (*Prunus avium* L.). Estas secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo T-coffee (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/) y posteriormente, para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA7 (Tamura *et al.*, 2011) mediante el método *Neighbor-Joining* con 1000 réplicas de iteración.

Códigos de acceso: AtSIP1;1 (AT3G04090.1); AtSIP1;2 (AT5G18290.1); AtSIP2;1 (AT3G56950.2); CpSIP1;1 (evm.TU.contig_33833.1); CpSIP2;1 (evm.model.supercontig_92.56); CsSIP1;1 (orange1.1g026082m); CsSIP1;2 (orange1.1g026039m); CsSIP2;1 (orange1.1g026600m); FvSIP1;1 (mrna16797.1-v1.0-hybrid); FvSIP1;2 (mrna23950.1-v1.0-hybrid); FvSIP1;3 (mrna23951.1-v1.0-hybrid); FvSIP2;1 (mrna16181.1-v1.0-hybrid); MdSIP1;1 (MDP0000905147); MdSIP1;2 (MDP0000246926); MdSIP1;3 (MDP0000768606); MdSIP1;4 (MDP0000177150); MdSIP1;5 (MDP0000563899); MdSIP2;1 (MDP0000119818); MdSIP2;2 (MDP0000281232); MdSIP2;3 (MDP0000927246PtSIP1;1); MtSIP1;1 (Medtr7g085070.1); MtSIP1;2 (Medtr6g033010.1); MtSIP1;3 (Medtr4g049340.1); MtSIP2;1 (Medtr7g088310.1); MaSIP1-1 (GSMUA_Achr11T14150_001); MaSIP2;1 (GSMUA_Achr5T21450_001); MaSIP2;2 (GSMUA_Achr5T27600_001); PtSIP1;1 (Potri.002G227500.1); PtSIP1;2 (Potri.014G154400.1); Prupe.3G216100; Prupe.7G000900; Prupe.7G020600; SISIP1;1 (Solyc12g019690.1.1); SISIP1;2 (Solyc10g078490.1.1); SISIP2;1 (Solyc01g056720.2.1); SbSIP1;1

(Sobic.005G091600.1);	SbSIP1;2	(Sobic.009G131500.1);	SbSIP2;1
(Sobic.001G389900.1);	VvSIP1;1	(GSVIVT01033371001);	VvSIP2;1
(GSVIVT01025840001);	ZmSIP1;1	(Zm00008a015119_T01);	ZmSIP2;1
(Zm00008a001341_T01)			

3. Análisis de dominios estructurales

Para el análisis de los dominios proteicos de los genes miembros de la subfamilia SIP, presentes en las secuencias aminoacídicas de los portainjertos 'Mariana 2624' y 'Mazzard F12/1', se utilizó el servidor InterProScan, versión 5.0 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). La identificación de dominios transmembrana encontrados en los genes de interés, se realizó analizando los resultados de los programas MEMSAT3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/?id=756>) y Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>). Para identificar la ubicación del péptido señal en la secuencia aminoacídica de la acuaporina candidata SIP1;2 de 'Mariana 2624' (PrucxmSIP1;2) se utilizaron los programas Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) y PrediSi (<http://www.predisi.de/>).

4. Análisis de región promotora

El análisis de la región promotora de los genes pertenecientes a la subfamilia SIP se realizó mediante la utilización de dos herramientas bioinformáticas: PlantCARE (<http://oberon.rug.ac.be:8080/PlantCARE/index.html>) y NewPLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>). Para el análisis se utilizó la secuencia de 1000 pares de bases río arriba a partir del sitio de inicio de la transcripción de cada secuencia de interés.

Metodología objetivo 2: Determinar la localización subcelular del gen candidato *PrucxmSIP1;2* en *Nicotiana benthamiana*.

1. Aislamiento de gen *PrucxmSIP1;2*

La secuencia codificante del gen *PrucxmSIP1;2* fue aislada por medio de PCR convencional utilizando la enzima polimerasa *Thermo High-Fidelity* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) y como templado ADNc de 'Mariana 2624' que fue obtenido previamente con el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (*Fermentas, Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante. Se emplearon los partidores SIP1;2dir (Tabla 1), los cuales contienen la secuencia 5'-CACC-3' en el extremo 5' del partidor *Forward*, lo que permite clonar direccionalmente (5' → 3') el producto de PCR en el vector pENTRTM/SD/D-TOPO Cloning Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos). Para la amplificación del fragmento se utilizó: 1 µl de templado y se mezcló con 4 µl Buffer 5X, 0,4 µl dNTPs, 0,4 µl de cada partidor, 13,6 µl de agua ultra pura y 0,2 µl de *Thermo High-Fidelity* y en el termociclador fue utilizado el siguiente programa: denaturación a 95°C por dos minutos, seguido de 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 68°C por un minuto). Para terminar se realizó una etapa final de elongación a 68°C por 30 minutos. Para corroborar la correcta amplificación del gen *PrucxmSIP1;2*, se visualizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (Tris 0,08 M, Ácido Bórico 0,08M, Na₂EDTA 0,5 M; pH 8,0).

2. Clonación de gen *PrucxmSIP1;2* en vector de entrada

La secuencia de largo completo aislada del gen *PrucxmSIP1;2* fue ligado al vector de entrada pENTRTM/SD/D-TOPO Cloning Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) (Figura 3), para posteriormente transformar células de *Escherichia coli* (TOP10) (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) químicamente competentes con dicho vector. Para esto, se incubó el vector con el fragmento por 30 minutos, luego se tomaron 3 µl del mix de ligación y se mezclaron con 25 µl de células competentes. La mezcla fue incubada 10 minutos en hielo, luego 45 segundos a 42 °C y nuevamente mantenidas en hielo por dos minutos. Posteriormente se adicionaron 250 µl de medio S.O.C. (*Super Optimal broth*

with Catabolite repression) y se incubaron a 37 °C con agitación durante dos horas, para la recuperación de la pared celular. Al pasar la hora de incubación, el cultivo fue sembrado en placas con medio Luria Bertani (LB) con kanamicina (100 mg/L) como medio de selección. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 12 horas. Luego, las colonias fueron analizadas mediante PCR convencional para verificar la presencia del constructo con el gen de interés, para esto se utilizaron los partidores SIP1;2dir con los cuales se amplificó específicamente el gen *PrucxmSIP1;2* (Tabla 1). A las colonias que presentaban el gen de interés, se les realizó la extracción del vector con el kit comercial *E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II* (Omega Bio-tek Inc., Georgia), según instrucciones del fabricante.

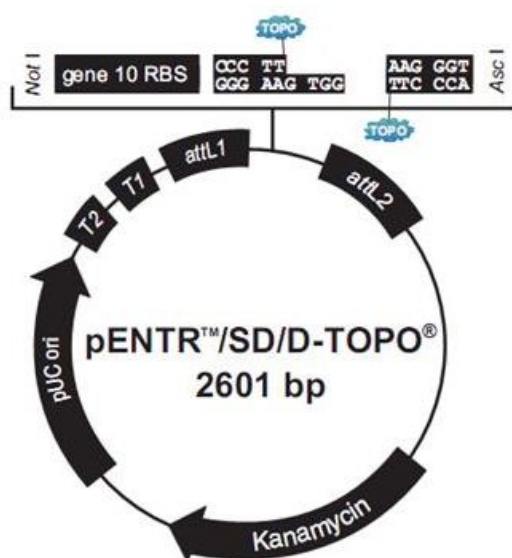


Figura 3. Esquema de vector de entrada pENTR/SD/D-TOPO. Vector de entrada para clonar gen *PrucxmSIP1;2*. Este vector le da direccionalidad al gen de interés, entrega resistencia a kanamicina a la bacteria para posterior selección y posee los extremos attL1 y attL2, para realizar la recombinación con vector de destino, mediante la técnica *Gateway*.

Tabla 1: Partidores utilizados

Partidores	Secuencia 5'→3'	TM	Amplición (pb)
SIP1;2dir	F-CACCATGGGTGCGATTAAGGCAG R-GGCCTTCTTGGCCTTCTTCTTTTG	60	743
GFP	F-GTGACCACCTTCACCTACGG R-TCTCGTTGGGGTCTTTGCTC	57	458
HYG	F-TGCCGTCAACCAAGCTCTGATA R-ACGTTGCAAGACCTGCCTGAAA	55	551
qSIP1;2SI	F-GGAATCGGGTGGCAACGGTAA R-TGCTCAAGGAATGGCTTCGCTA	58	176
qSIP1;2Pp	F-ACTCAAGGGTCCTCGTAGCC R-CTATGAAAGGGCAAATCCAAT	55	191
TBP	F-GCTAAGAACGCTGGACCTAATG R-TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	58	183

TM= Temperatura de fusión (Melting temperatura)

3. Recombinación de vectores

El vector de entrada fue recombinado con en el vector de destino pGWB505 (Nakagawa *et. al*, 2007) (Figura 4A) mediante la técnica *Gateway* según instrucciones del fabricante, dicho vector permite ligar el gen de interés a una proteína de fluorescencia (GFP). La reacción de recombinación fue mediada por la clonasa LR (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) obteniendo el constructo *PrucxmSIP1;2::GFP* (Figura 4B). Posteriormente se realizó la transformación de *E.coli* (TOP10) con el vector recombinante y se seleccionaron las colonias que incorporaron el vector en un medio de selección con espectomicina (75 mg/L). A las colonias seleccionadas se les realizó una extracción plasmidial con el kit comercial E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II, que se utilizó anteriormente, según instrucciones del fabricante.

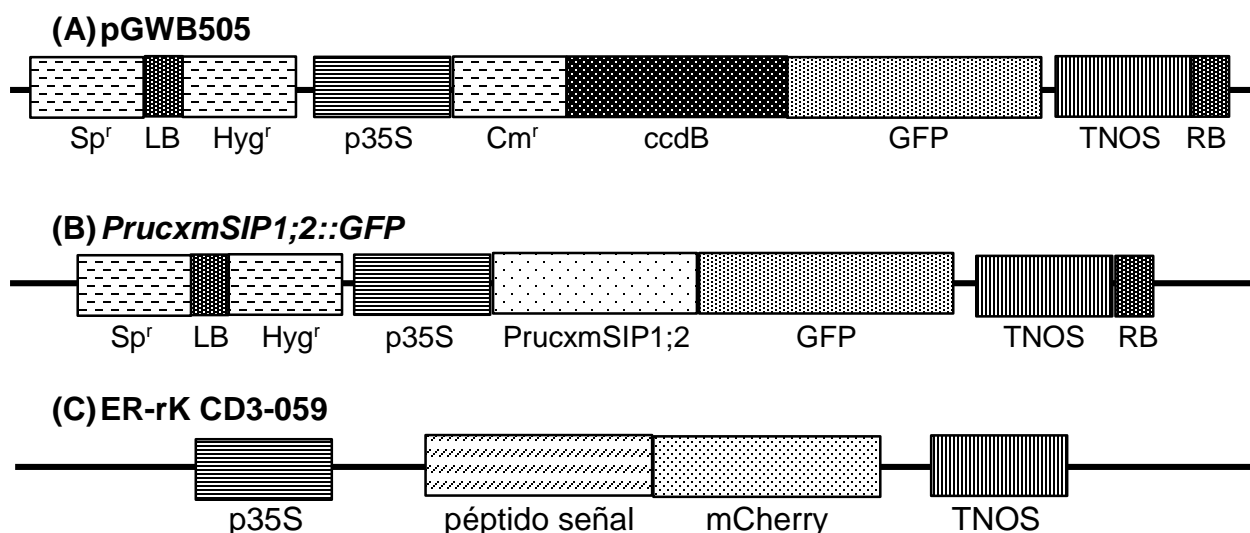


Figura 4. Esquema de vectores utilizados. (A) Vector de destino comercial, el cual presenta un promotor fuerte (p35S) y GFP (B) Constructo obtenido de la recombinación del gen de interés *PrucxmSIP1;2* con el vector de destino pGWB505 (C) Vector que contiene un péptido señal para destinación en retículo endoplasmático, fusionada con mCherry. Sp^r y Hyg^r son las resistencias de cada vector a espectinomicina y a higromicina, respectivamente

4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con vector recombinante

Para realizar la transformación de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, se agregó 5 µl del vector a 50 µl de *A. tumefaciens*, se dejaron en hielo por 10 minutos y se congelaron con nitrógeno líquido. Luego, fueron sometidas un shock de calor en baño termoregulado a 37 °C por 5 minutos. Se les agregó 1 mL de LB y la recuperación de la membrana celular de las células transformadas, fue realizada a 28 °C durante tres horas en agitación constante. Posterior a esto, se centrifugaron a 3000 RPM por tres minutos y se resuspendió el pellet en 100 µl de LB para luego ser sembrado en placas de LB con espectinomicina (75 mg/L) como medio de selección, las cuales fueron incubadas durante 48 horas a 28°C. Las colonias resistentes al antibiótico fueron analizadas por PCR convencional con partidores específicos para gen *PrucxmSIP1;2* y GFP (Tabla 1).

5. Transformación transitoria y localización subcelular en *Nicotiana benthamiana*

Para determinar la localización subcelular del gen *PrucxmSIP1;2*, se utilizaron dos cepas de *A. tumefaciens*; la primera es la anteriormente transformada con el constructo *PrucxmSIP1;2::GFP* (Figura 4B) y la segunda es una cepa que contiene el vector ER-rk CD3-959 (Figura 4C), el cual posee un marcador de retículo endoplasmático ligado a mCherry (donado por la Dra. María Francisca Blanco, Centro de Biotecnología Vegetal, Universidad Andrés Bello).

La transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana*, se realizó mediante la inoculación de las dos cepas de *A. tumefaciens* mencionadas en el párrafo anterior. Éstas fueron cultivadas en 5 mL de medio LB a 28°C en agitación constante, hasta obtener una OD₆₀₀ de valor 0,2. Posteriormente se centrifugó a 6000 RPM por 20 minutos y se resuspendió el *pellet* en un buffer de infiltración (50 nM MES pH 5,6, 0,5% glucosa, 100 uM acetosiringona) hasta obtener una OD₆₀₀ igual a 0,3. Se infiltraron hojas de tabaco (*N. benthamiana*) de dos meses de edad por su cara abaxial con una jeringa de 1 mL con mix de ambos cultivos y se mantuvieron tres días en las mismas condiciones de crecimiento controlado (25°C; 400-500 PAR; 50% HR).

La localización subcelular fue observada mediante un microscopio laser confocal Olympus FV1000 en la Universidad Andrés Bello. Las longitudes de onda utilizadas para poder observar los fluoróforos se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Longitud de onda de excitación y emisión de fluoróforos utilizados en co-infiltración

	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
GFP	488	507
mCherry	587	610

Metodología objetivo 3: Evaluar la tolerancia de *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom que sobreexpresa el gen *PrucxmSIP1;2* al estrés por hipoxia radical.

1. Transformación estable de *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom

Para la generación de plantas que sobreexpresen el gen de interés *PrucxmSIP1;2* se utilizaron semillas de *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom (tomate cv. MicroTom), las que fueron desinfectadas en etanol al 70% por cinco minutos y luego en una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 45 minutos. Las semillas fueron posteriormente germinadas en medio de germinación (MG) (Tabla 3) a 25°C.

Se transformaron cotiledones de cinco días de edad con la cepa transformada de *A. tumefaciens* (GV3101), obtenida en el objetivo 2 que posee el constructo *PrucxmSIP1::GFP* (Figura 4B). Para esto, la cepa transformada fue incubada por 24 horas a 28°C en agitación constante en medio LB con espectinomicina como medio de selección. Posteriormente, se centrifugó a 6000 RPM por 20 minutos y se resuspendió el *pellet* en medio Murashige y Skoog (MS) líquido suplementado con 100 uM de acetosiringona, se incubó nuevamente a 28°C en agitación constante hasta alcanzar una OD₆₀₀ 0,1. Se cortaron los cotiledones en el ápice y en la base y se dejaron en contacto con la cepa durante 15 minutos con agitación constante. Finalizada la incubación, los cotiledones fueron traspasados a un medio de co-cultivo (MCC) (Tabla 3) y se mantuvieron en oscuridad a 25°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, los cotiledones fueron cambiados a un medio inducción (MI) (Tabla 3) hasta la obtención de callos.

Al generar diferenciación celular, los brotes fueron cambiados a un medio de elongación (ME) y luego a medio de enraizamiento (MR) (Tabla 3). Al aparecer raíces en las plántulas, estas se trasladaron a condiciones *ex vitro*, utilizándose como sustrato una mezcla de turba, vermiculita, perlita y arena a razón 1:1:1:1 (v/v/v/v).

Tabla 3: Medios utilizados para cultivo *in vitro*

	Medio MS	Medio MCC	Medio MI	Medio ME	Medio MR
MS	2,2 g/L	4,43 g/L	4,43 g/L	4,43 g/L	4,43 g/L
Sacarosa	15 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Agar Plant	4 g/L	5,5 g/L	5,5 g/L	5,5 g/L	5,5 g/L
Carbón activado	-	-	-	-	1 g/L
Zeatina	-	1,5 mg/L	1,5 mg/L	1 mg/L	0,5 mg/L
Higromicina	-	-	5 mg/L	5 mg/L	5 mg/L
Augmentina	-	-	500 mg/L	250 mg/L	250 mg/L

MS=Murashige y Skoog; MCC=Medio de Co-cultivo; MI=Medio de Inducción; ME=Medio de Elongación; MR= Medio de Enraizamiento

2. Extracción de ADN

Para comprobar la presencia del gen *PrucxmSIP1;2* en las dos líneas transgénicas (E1 y E2) que fueron obtenidas, se extrajo ADN genómico de hojas de plantas de la generación T0 y de plantas no transformadas (WT) de *S. lycopersicum* cv. MicroTom. Para la extracción de ADN genómico, fueron molidos 100 mg de tejido vegetal con nitrógeno líquido. Se agregó 700 µl buffer de extracción a cada una de las muestras [CTAB 2%, polivinilpirrolidona (PVP) K-30 2%, Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2,0 M, 0,5 g/L espermidina, β-mercaptoetanol 2%] de CTAB β-mercaptoetanol 2%] precalentado a 65°C. Se incubaron a 65°C por 20 minutos y posteriormente se agregaron 600 µl de cloroformo alcohol isoamílico (AIA) (24:1), posteriormente se mezcló con un agitador tipo vórtex. Después de la agitación, la muestra se centrifugó a 8000 RPM por 15 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le agregó nuevamente 600 µl volumen de cloroformo AIA y se centrifugó la muestra a 8000 RPM por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se agregó 1,5 de volumen de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C, y se dejó precipitando una hora a -20°C. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue eliminado, el *pellet* fue lavado con 500 µl de etanol frío al 80% y posteriormente centrifugado a 10000 RPM por 5 minutos a 4°C. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente, ya una vez seco se resuspendió 50 µl de agua ultra pura y fue almacenado a -20°C.

3. Selección de plantas transgénicas

Se seleccionaron las plantas transgénicas al evaluar la presencia del gen candidato *PrucxmSIP1;2* y de los genes que codifican para la proteína fluorescente verde (GFP) e higromicina mediante PCR convencional. Para esto se utilizaron los partidores: qSIP1;2Pp, GFP y HYG (Tabla 1).

4. Extracción ARN total

Para determinar si el gen *PrucxmSIP1;2* se expresa, se realizó la extracción de ARN, utilizando hojas de plantas WT y transgénicas de generación T1 (E1 y E2) de dos meses de edad. Estas hojas fueron congeladas con nitrógeno líquido y pulverizadas con mortero, para posteriormente realizar extracción de ARN, mediante la utilización del reactivo TRI (Life Technologies, Carlsbad, CA), según indicaciones del fabricante. Luego las muestras fueron tratadas con DNasa I (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos), como lo indica el fabricante. La integridad de cada muestra de ARN total se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó la concentración de ARN con la utilización de Nanoquant, Infinite M200 Pro (Tecan, Suiza)

5. Síntesis de ADN complementario

La síntesis del ADN complementario (ADNc) de las muestras de ARN total se realizó mediante transcripción reversa utilizando el kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante.

6. Análisis de expresión génica

Posteriormente a las muestras se les realizó un análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR) para comprobar la expresión del gen *PrucxmSIP1;2* y el gen endógeno en tomate cv. MicroTom, *Solyc10g078490.1.1* (*SISIP1;2*). Para el análisis se utilizaron los partidores qSIP1;2Pp y qSIP1;2SI, respectivamente (Tabla 1). El ensayo de qPCR fue realizado con el equipo Mx3000P QPCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) utilizando el kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante. Como control endógeno

del análisis transcripcional se utilizó el gen TATA *binding protein* (*TBP*) de *S. lycopersicum* (Tabla 1) (Espósito-Rodríguez *et al.*, 2008).

7. Caracterización fenotípica de líneas transgénicas

Se evaluaron diferentes características morfológicas, tales como: altura de planta tomando de punto de inicio la base de la “maceta”; largo del foliolo (se tomaron hojas de misma etapa de desarrollo); conteo del número de flores a los dos meses de germinación. Todos estos parámetros fueron previos al estrés por hipoxia. Luego de los 16 días del tratamiento se contó el número de frutos y el peso de estos, tanto de plantas control como de plantas tratadas.

8. Tratamiento de inundación para la generación de hipoxia radical

Se seleccionaron ocho plantas WT de *S. lycopersicum* cv. MicroTom, 14 plantas de la línea transgénica E1 y ocho plantas de la línea E2, todas de dos meses de edad, las cuales fueron colocadas dentro de contenedores de plástico (Figura 5). La mitad de las plantas de cada línea y WT fueron sometidas a estrés por hipoxia, el cual fue generado rellenando una batea con agua la cual fue bombeada con nitrógeno gaseoso (1 L/min) para desplazar el O₂ y generar una condición hipóxica (concentración de O₂ inferior a 4 mg/L) alrededor de la zona de la raíz. Luego, se incorporaron las plantas dentro de la batea (Pimentel *et al.*, 2014) las cuales deben quedar con el agua hasta 2 cm sobre la superficie de la maceta. Las concentraciones de O₂, tanto en las macetas y en el agua circundante se registraron periódicamente durante el experimento usando un medidor de oxígeno disuelto portátil (Extech, Nashua, New Hampshire, EEUU). La otra mitad fueron usadas como control, las cuales fueron situadas en bateas sin agua y regadas cada cuatro días.

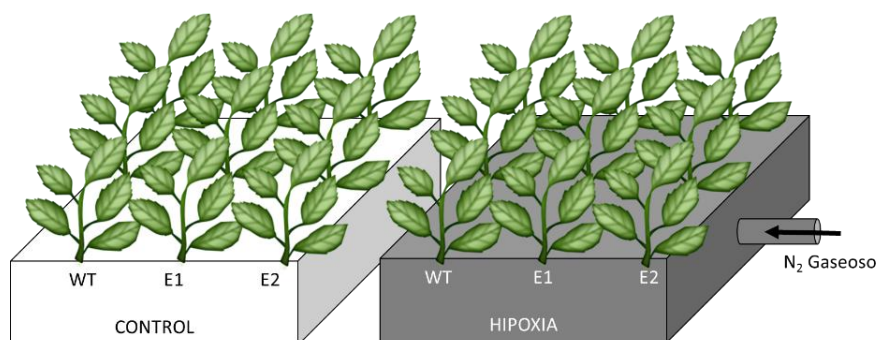


Figura 5. Esquema de tratamientos de material vegetal. Modelo de tratamiento de inundación para generar estrés por hipoxia radical para la evaluación de tomates cv. MicroTom transformados con gen *PrucxmSIP1;2*.

9. Caracterización fisiológica

La evaluación de la tolerancia al estrés por hipoxia se determinó a través de evaluaciones fisiológicas, con la medición de parámetros de intercambio gaseoso principales como fotosíntesis neta y conductancia estomática, los cuales fueron determinados mediante un medidor de fotosíntesis IRGA (*Infrared Gas Analyzer*) CIRAS-2 (PP-Systems, United Kingdom). Estas mediciones se realizaron a los 0, 1, 3, 5 y 16 días. El tiempo 0 representa las plantas antes del tratamiento.

Además, se determinó la densidad estomática de hojas de plantas WT y plantas transgénicas (E1 y E2) antes y después de 16 días de inundación. Las impresiones fueron tomadas de la parte abaxial de las hojas con la utilización de esmalte de uñas transparente, este posteriormente se extrajo y se puso sobre portaobjetos. Se sacaron impresiones de cuatro hojas por línea para ambas condiciones y fueron observadas en dos diferentes campos de visión con un microscopio vertical Oxion (Euromex, Países Bajos).

Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el *software* GraphPad Prism, versión 7 (<https://graphpad.com/>). Los test de comparación múltiple fueron utilizados para encontrar diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Resultados Objetivo 1: Caracterizar bioinformáticamente las secuencias codificantes y promotoras de acuaporinas de la subfamilia SIP de los genotipos contrastantes a la hipoxia radical ‘Mariana 2624’ y ‘Mazzard F12/1’.

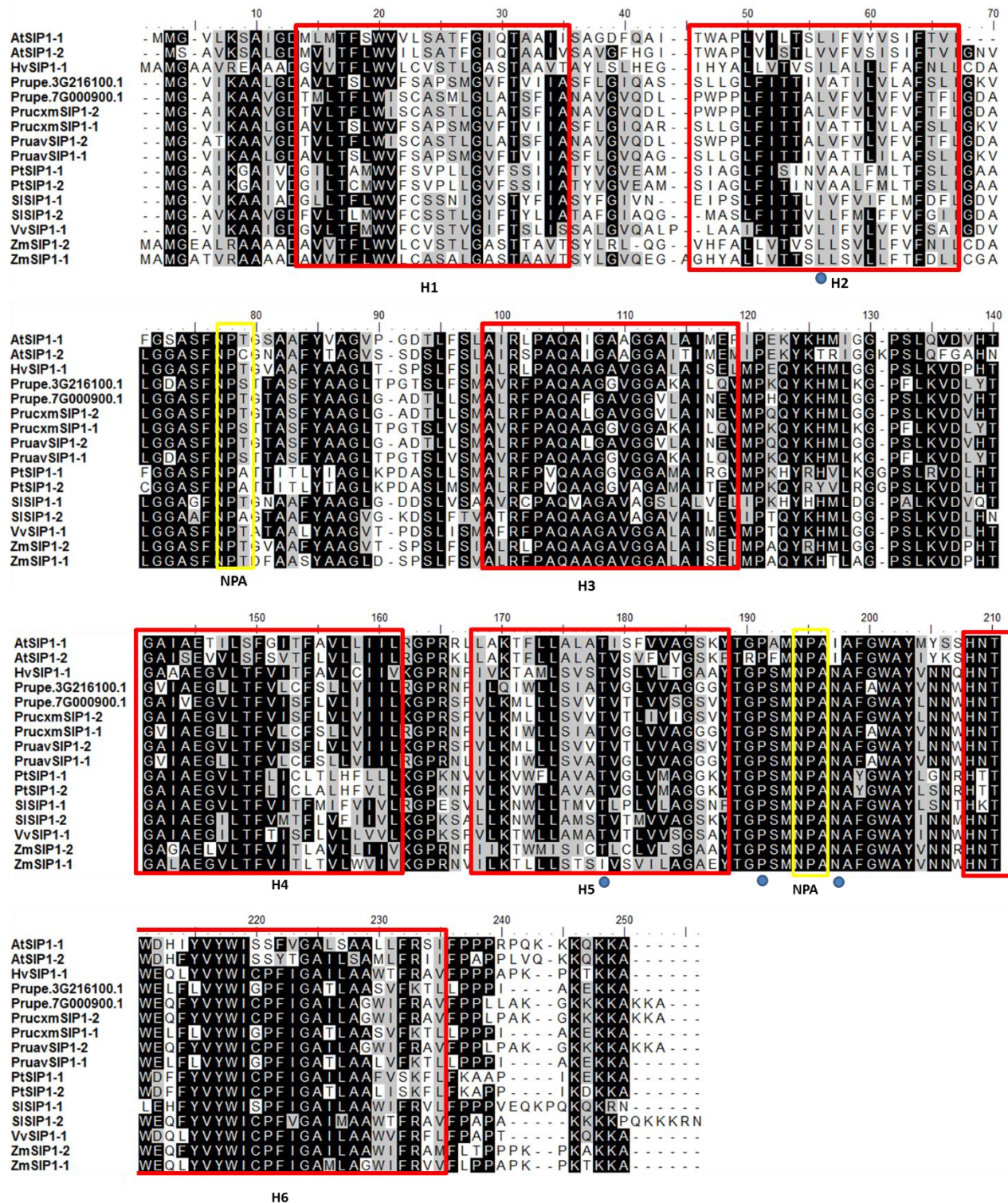
Para analizar el grado de conservación que presentan estas acuaporinas, se utilizó la base de datos Phytozome (<http://www.phytozome.org>) y se encontraron tres secuencias aminoacídicas que codifican para acuaporinas de la subfamilia SIP en el genoma del duraznero v2.0 (Prupe.3G216100, Prupe.7G000900, Prupe.7G020600), con esta información se buscaron secuencias homólogas en distintas especies: *Arabidopsis thaliana* (AtSIP1;1, AtSIP1;2, AtSIP2;1), *Carica papaya* (CpSIP1;1, CpSIP2;1), *Citrus sinensis* (CsSIP1;1, CsSIP1;2, CsSIP2;1), *Fragaria vesca* (FvSIP1;1, FvSIP1;2, FvSIP2;1), *Hordeum vulgare* (HvSIP1;1, HvSIP2;1), *Malus domestica* (MdSIP1;1, MdSIP1;3, MdSIP1;4, MdSIP1;5, MdSIP2;1, MdSIP2;2, MdSIP2;3), *Medicago truncatula* (MtSIP1;1, MtSIP1;2, MtSIP1;3, MtSIP2;1), *Musa acuminata* (MaSIP1;1, MaSIP2;1, MaSIP2;2), *Populus trichocarpa* (PtSIP1;2, PtSIP2;1), *Solanum lycopersicum* (SlSIP1;1, SlSIP1;2, SlSIP2;1), *Sorghum bicolor* (SbSIP1;1, SbSIP1;2, SbSIP2;1), *Vitis vinifera* (VvSIP1) y *Zea mays* (ZmSIP1;1, ZmSIP1;2, ZmSIP2;1). Producto de la re-secuenciación del genoma de los genotipos de interés, se pudieron identificar las secuencias promotoras y codificantes de acuaporinas SIP de ‘Mazzard F12/1’ (PruavSIP1;1, PruavSIP1;2, y PruavSIP2) y de ‘Mariana 2624’ (PrucxmSIP1;1, PrucxmSIP1;2 y PrucxmSIP2).

	Prupe.3G216100	PrucxmSIP1;1	PruavSIP1;1	Prupe.7G000900	PrucxmSIP1;2	PruavSIP1;2	Prupe.7G020600	PrucxmSIP2	PruavSIP2
Prupe.3G216100	100	98	96	61	62	63	32	32	32
PrucxmSIP1;1	98	100	97	62	63	64	33	32	32
PruavSIP1;1	96	97	100	62	62	63	33	32	32
Prupe.7G000900	61	62	62	100	96	96	37	37	37
PrucxmSIP1;2	62	63	62	96	100	98	37	37	37
PruavSIP1;2	63	64	63	96	98	100	36	36	36
Prupe.7G020600	32	33	33	37	37	36	100	98	98
PrucxmSIP2	32	32	32	37	37	36	98	100	98
PruavSIP2	32	32	32	37	37	36	98	99	100

Figura 6. Matriz de identidad de secuencias de la subfamilia SIP. Identidad de secuencias aminoacídicas de las tres isoformas pertenecientes a la subfamilia SIP (SIP1;1, SIP1;2, SIP2), de ambos portainjertos ('Mariana 2626' y 'Mazzard F12/1') y de *Prunus persica*.

Junto con el alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la subfamilia SIP de diferentes especies, se realizó una matriz de identidad de las secuencias que pertenecen al género *Prunus* spp. (Figura 6). El porcentaje de identidad de las secuencias homólogas es alto, sobre el 96%. Al comparar el porcentaje de identidad entre secuencias parálogas disminuye a un 60% y el porcentaje de identidad entre las isoformas de los distintos subgrupos (SIP1 y SIP2), es cercana al 32%. Debido a esta baja identidad entre las secuencias de ambos subgrupos se realizaron dos alineamientos, en los cuales se identificaron las regiones características de las acuaporinas que le confieren especificidad; dos motivos NPA y la región de constricción ar/R (Figura 7A y B).

(A) SIP1



(B) SIP2

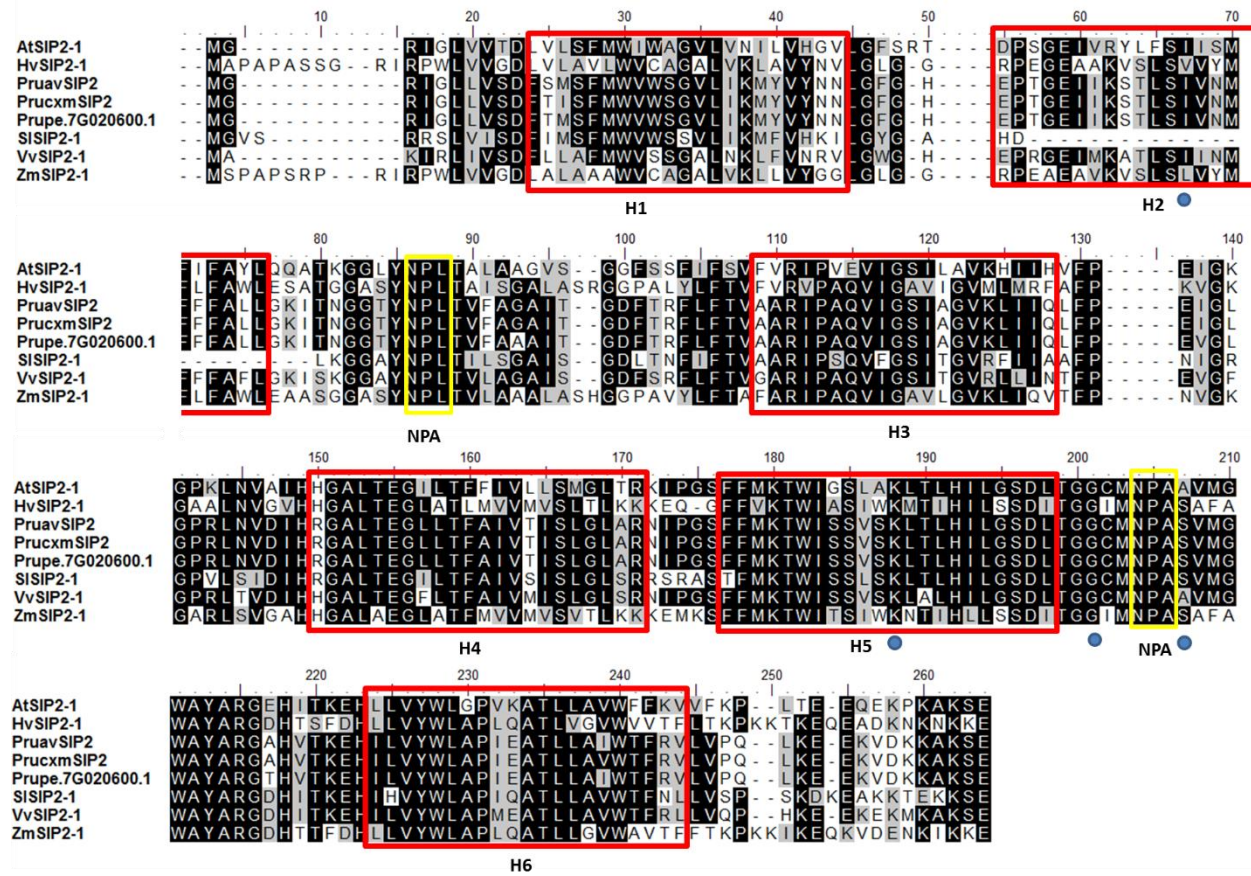


Figura 7. Alineamiento de secuencia aminoacídica de acuaporinas SIP. (A) SIP1 (B) SIP2.

Las secuencias de *A. thaliana*, *H. vulgare*, *P. avium*, *P. cerasifera* x *P. munsoniana*, *P. persica*, *S. lycopersicum*, *P. trichocarpa*, *V. vinifera* y *Z. mays*, muestran seis dominios transmembrana en cuadros rojos (H1-H6), dos motivos conservados NPA (cuadros amarillos) y cuatro aminoácidos correspondientes al filtro de ar/R (círculo azul).

Se puede observar, que el primer motivo NPA es variable entre las acuaporinas de la subfamilia SIP, esta variación se ubica en el aminoácido alanina donde se observa una sustitución por serina (Prupe.3G216100, PruavSIP1;1, PrucxmSIP1;1), por treonina (Prupe.7G000900, PruavSIP1;2, PrucxmSIP1;2) o por leucina (Prupe.7G020600, PruavSIP2, PrucxmSIP2), mientras que el segundo motivo NPA es conservado (Tabla 4). Con respecto al motivo ar/R, tres residuos son altamente conservados en las especies estudiadas. En las acuaporinas SIP1 observamos una treonina en H5, una prolina en LE1 y una asparragina en LE2, mientras que para acuaporinas SIP2 encontramos una lisina en H5, una glicina en LE1 y una serina en LE2. Interesantemente, se observa en esta subfamilia, al igual que en los motivos NPA, una variación en el residuo ubicado en H2. En el caso de las SIP de *Prunus sp*, podemos observar una treonina en SIP1;1, una fenilalanina en SIP1;2 o una isoleucina en SIP2. Al analizar las secuencias aminoacídicas de las acuaporinas de los portainjertos en estudio no se observaron diferencias entre ellos en los motivos claves (Tabla 4).

Tabla 4: Motivos NPA y filtro de selectividad ar/R de acuaporinas SIP. Se muestran los aminoácidos presentes en los motivos NPA (I y II) y los cuatro aminoácidos de la región ar/R, con sus respectivas posiciones (H2, H5, LE1 y LE2).

Grupo	Nombre gen	Motivo NPA		ar/R			
		I	II	H2	H5	LE1	LE2
SIP1	AtSIP1;1	NPT	NPA	F	T	P	I
	AtSIP1;2	NPC	NPA	F	T	P	I
	HvSIP1;1	NPT	NPA	A	T	P	N
	PtSIP1;1	NPA	NPA	A	T	P	N
	PtSIP1;2	NPA	NPA	A	T	P	N
	Prupe.3G216100	NPS	NPA	T	T	P	N
	Prupe.7G000900	NPT	NPA	F	T	P	N
	PruavSIP1;1	NPS	NPA	T	T	P	N
	PruavSIP1;2	NPT	NPA	F	T	P	N
	PrucxmSIP1;1	NPS	NPA	T	T	P	N
	PrucxmSIP1;2	NPT	NPA	F	T	P	N
	SISIP1;1	NPT	NPA	F	T	P	N
	SISIP1;2	NPA	NPA	F	T	P	N
	VvSIP1;1	NPT	NPA	L	T	P	N
	ZmSIP1;1	NPT	NPA	S	I	P	N
	ZmSIP1;2	NPT	NPA	S	T	P	N
SIP2	AtSIP2;1	NPL	NPA	I	K	G	A
	HvSIP2;1	NPL	NPA	V	K	G	S
	Prupe.7G020600	NPL	NPA	I	K	G	S
	PruavSIP2	NPL	NPA	I	K	G	S
	PrucxmSIP2	NPL	NPA	I	K	G	S
	SISIP2;1	NPL	NPA	-	K	G	S
	VvSIP2;1	NPL	NPA	I	K	G	A
	ZmSIP2;1	NPL	NPA	L	K	G	S

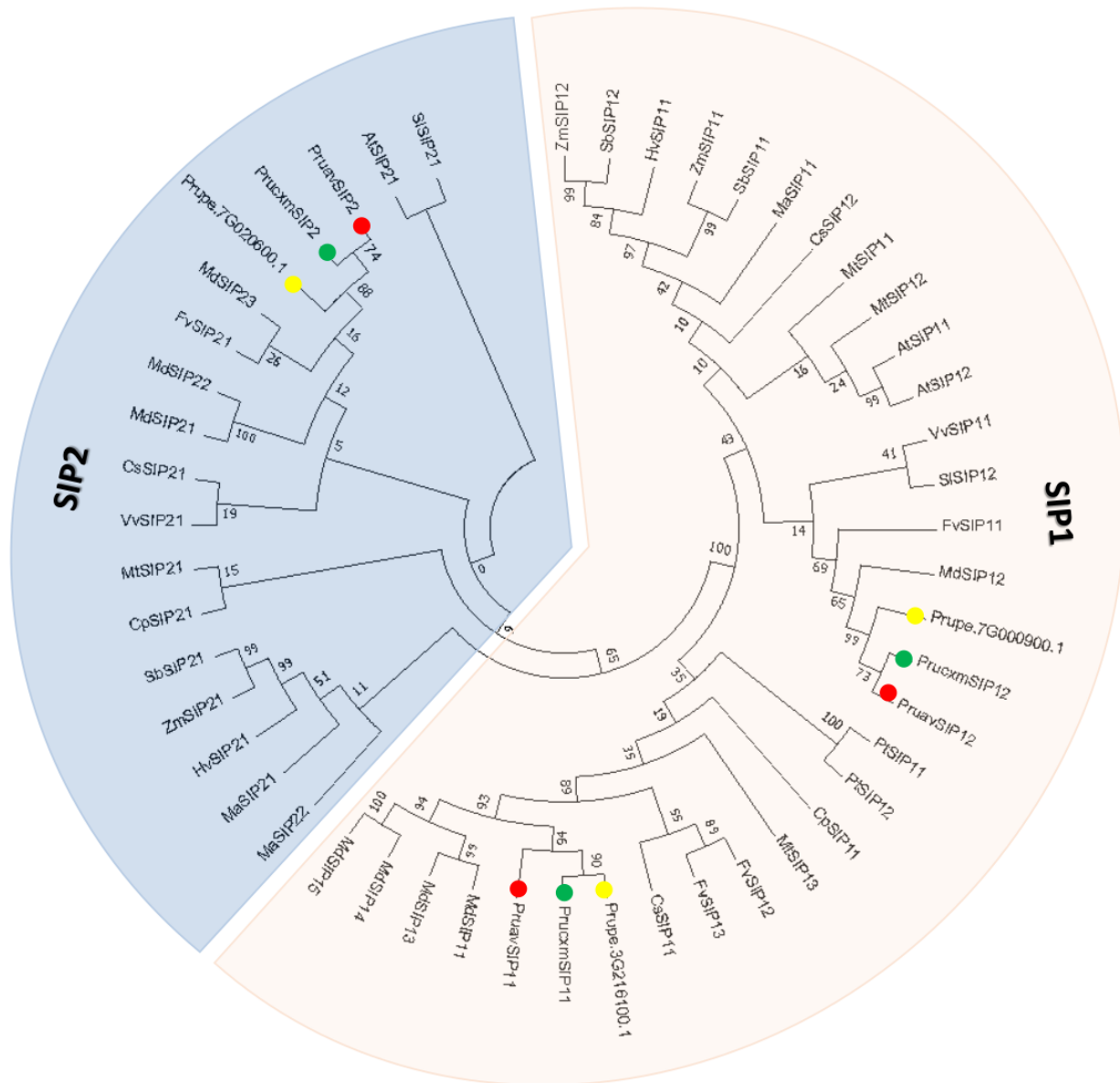


Figura 8. Análisis filogenético de la subfamilia SIP de diferentes especies. Los números cerca de los nodos corresponden a valores de iteración de 1000 réplicas. *P. cerasifera* x *P. munsoniana* (círculo verde), *P. avium* (círculo rojo), *P. persica* (círculo amarillo). Árbol generado con software MEGA6.

El análisis filogenético de la subfamilia SIP de las distintas especies encontradas se realizó mediante el método *Neighbor-Joining* y permitió clasificar las secuencias en dos subgrupos: SIP1 y SIP2, como lo indica la literatura (Johanson y Gustavsson, 2002). Las secuencias de *Prunus persica* se agruparon con las secuencias de los portainjertos 'Mariana 2624' y 'Mazzard F12/1', separándose claramente en los dos grupos, quedando en la misma rama Prupe.3G216100 con PrucxmSIP1;1 y PruavSIP1;1, Prupe.7G000900 con PrucxmSIP1;2 y PruavSIP1;2 y en el otra rama Prupe.7G020600 junto a PrucxmSIP2 y PruavSIP2 (Figura 8). También se puede observar, que las secuencias de especies de la misma familia se agrupan entre ellas, las pertenecientes a la familia de las Rosaceas (*Fragaria vesca*, *Malus domestica* y *Prunus spp.*) y también las correspondientes a la familia de las gramíneas (*Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*) (Figura 8).

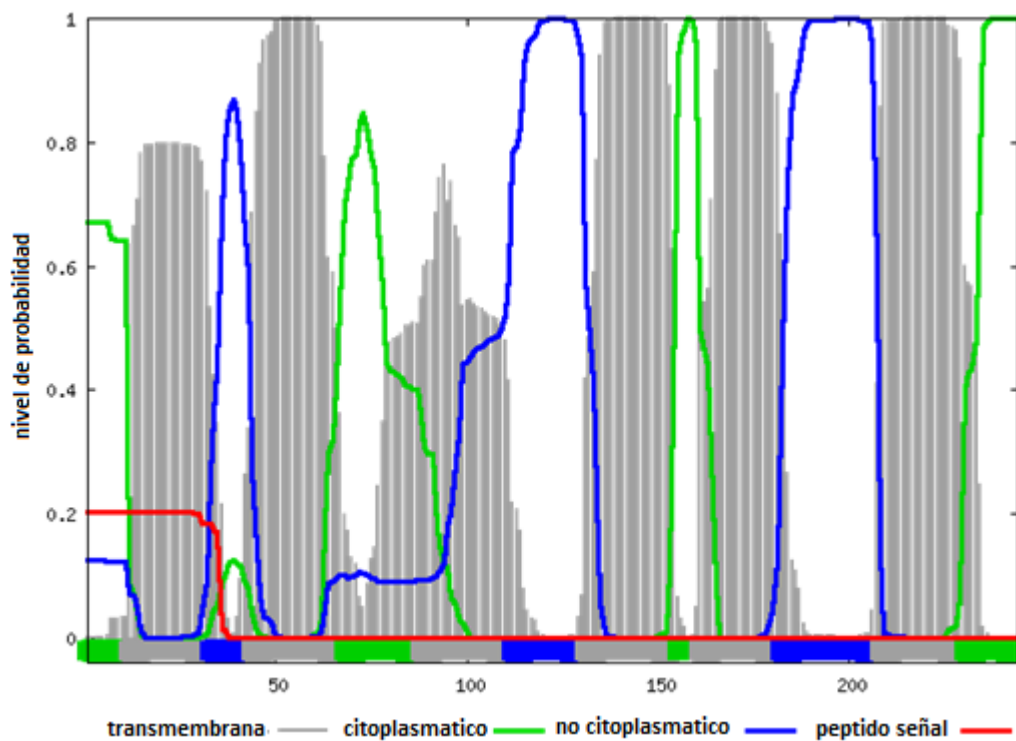


Figura 9. Predicción de dominios estructurales. Datos entregados mediante el programa Phobius. Indica seis regiones de transmembrana (barras grises), la zona ubicada en el espacio intracelular (línea verde) y la zona ubicada en el espacio extracelular (línea azul). La línea roja señala la ubicación del péptido señal.

Posteriormente, se analizaron en detalle los dominios estructurales de las acuaporinas de los genotipos contrastantes, pero como ejemplo se muestra la acuaporina PrucxmSIP1;2 por ser la de interés (Figura 9). Se comprobó la presencia de los seis dominios de transmembrana característicos de las acuaporinas. También se observa que tanto el extremo C-terminal como N-terminal se encuentran ubicados en el citoplasma y que esta proteína posee un péptido señal en el extremo N-terminal, específicamente en los primeros 30 aminoácidos (Figura 9). Según la base de datos Predotar (<https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html/>), existe un 64% de probabilidades de que esta acuaporina se localice en retículo endoplasmático.

Esta información se complementa al realizar un esquema de esta misma secuencia con el *software* Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>), el cual permite crear un esquema de una proteína, integrando la secuencia aminoacídica entregada con información experimental existente en otras plataformas *on-line* (Figura 10). De esta manera, permite visualizar de manera más clara los motivos y dominios de transmembrana. La membrana plasmática se presenta en color rosado y se observan los seis dominios que atraviesan la bicapa lipídica, los cuales están unidos por cinco loops, dos de ellos más alargados debido a que presentan los motivos NPA. Por otro lado, los extremos N-terminal y C-terminal, se encuentran ubicados hacia el citoplasma, ambos de similar longitud.

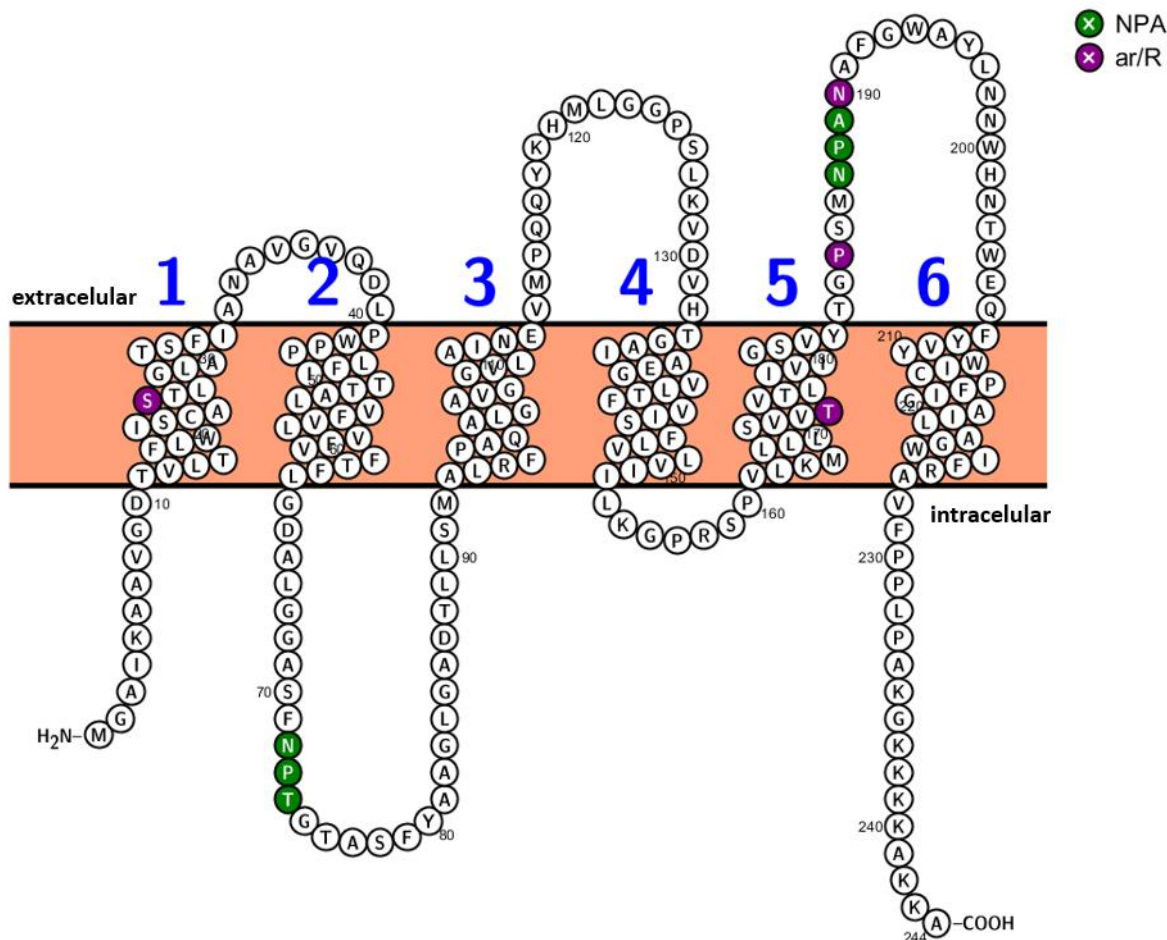


Figura 10. Esquema de acuaporina PrucxmSIP1;2. Se utilizó como template la secuencia de *PrucxmSIP1;2* de 'Mariana 2624'. En verde se observan los motivos NPA y en morado la región ar/R, se observan 6 dominios de transmembrana (1-6) y los números indican la posición de los aminoácidos. Para esto fue utilizado el software Protter.

Para determinar si la expresión de acuaporinas SIPs presentan alguna regulación transcripcional, se analizó la región promotora de los tres miembros de la subfamilia SIP de los portainjertos en estudio. Para esto seleccionamos 1000 pb río arriba del inicio del sitio de la transcripción. El análisis se concentró en la búsqueda de motivos de respuesta a anaerobiosis y motivos regulados por hormonas en *cis*, según la orientación de cada gen de interés, obteniendo nueve motivos: uno de estos motivos tiene relación con la respuesta a anaerobiosis (ARE), otro motivo está relacionado con la respuesta a ácido abscísico (ABRE), tres motivos de respuesta a giberelina (GARE, P-box y TATC), uno de respuesta a metil-jasmonato (CGTCA), otro relacionado con etileno (ERE), uno relacionado con auxina (TGA) y por último uno relacionado con la inducción de ácido salicílico (WRKY) (Tabla 5).

Tabla 5: Descripción de motivos de la región promotora. Información entregada por las bases de datos de PlantCARE y NewPLACE, de los diferentes motivos hallados en el análisis realizado.

Motivo	Descripción
ABRE	Motivo relacionado a la respuesta a ácido abscísico
ARE	Elemento de respuesta a anaerobiosis
CGTCA	Motivo relacionado a respuesta a Metil-jasmonato
ERE	Elemento de respuesta a etileno
GARE	Elemento de respuesta a giberelina
P-box	Elemento de respuesta a giberelina
TATC	Motivo relacionado con la respuesta a giberelina
TGA	Elemento de respuesta a auxina
WRKY	Motivo relacionado a la inducción por ácido salicílico

En la Figura 11, se muestra un esquema con la distribución de los motivos presentes en la región promotora de las tres SIP y se comparan estos motivos entre los dos genotipos contrastantes. Se observan diferentes motivos en la zona promotora de las tres isoformas de las acuaporinas SIP, solo el motivo ARE, el cual está relacionado con la regulación frente a anaerobiosis, se encuentra presente en todas las regiones promotoras. En el caso de las acuaporinas SIP1;1 y SIP2, presentan los mismos motivos al comparar los dos genotipos en estudio. En cambio, la acuaporina SIP1;2 del genotipo sensible ('Mazzard F12/1') tiene presente el motivo CGTCA, relacionado con metil-jasmonato, estando ausente en el genotipo tolerante ('Mariana 2624'). Por otra parte, la acuaporina SIP1;2 presenta una menor cantidad de motivos reguladores en su región promotora.

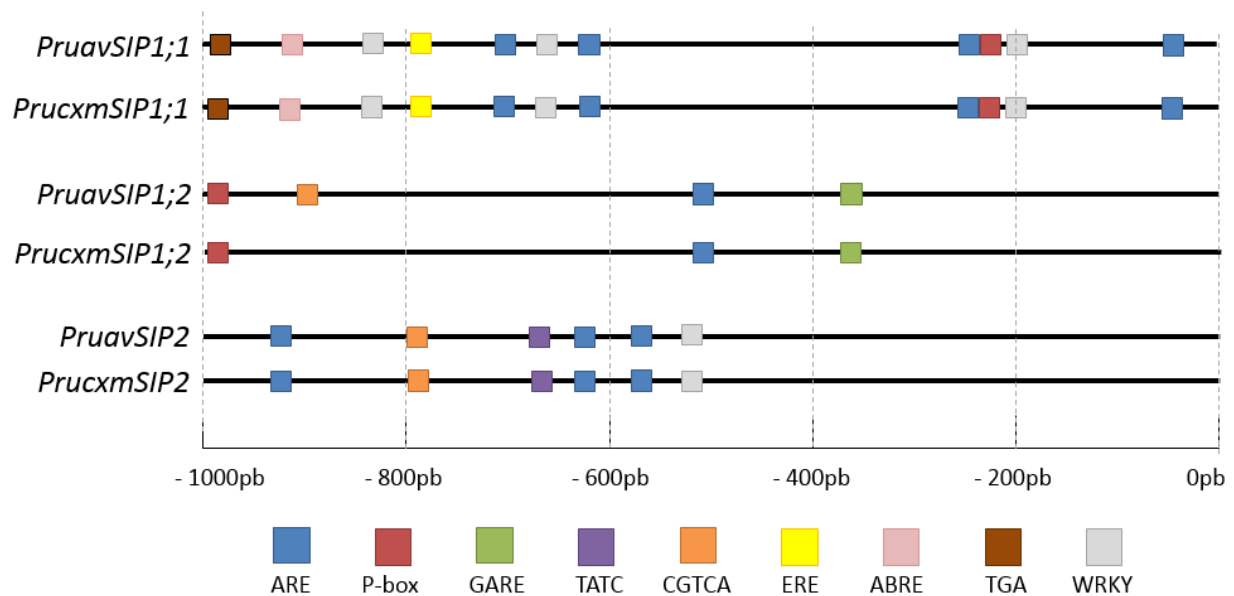


Figura 11. Esquema de motivos presentes en la región promotora. La ubicación de los diferentes motivos encontrados para los genes de interés en 'Mazzard F12/1' (*PruvavSIP1;1*, *PruvavSIP1;2* y *PruvavSIP2*) y 'Mariana 2624' (*PrucxmSIP1;1*, *PrucxmSIP1;2* y *PrucxmSIP2*). Los cuadrados de colores representan los distintos motivos encontrados y la barra inferior muestra la posición específica en la secuencia nucleotídica que estos se encuentran, siendo 0pb el sitio de inicio de la transcripción hasta llegar a -1000pb río arriba de dicha posición.

Resultados objetivo 2: Determinar la localización subcelular de la acuaporina *PrucxmSIP1;2* en *Nicotiana benthamiana*.

En estudios previos (ver sección Anexo), se estudió el patrón de expresión de los genes codificantes para acuaporinas de la subfamilia SIP, en raíces de los portainjertos con respuesta contrastante al estrés por hipoxia. De este estudio se pudo seleccionar el gen candidato *PrucxmSIP1;2*, el cual presenta una patrón de expresión diferencial entre ambos genotipos. En el genotipo tolerante, los transcritos del gen aumentan en respuestas al estrés por hipoxia y este patrón va incrementándose en el tiempo. A diferencia del genotipo sensible, donde la condición de falta de oxígeno en las raíces suprime la expresión del gen.

Para determinar la localización subcelular de la acuaporina *PrucxmSIP1;2*, se realizó la generación de un constructo, que posee el gen *PrucxmSIP1;2* ligado a la proteína GFP, el cual se expresó de manera transitoria en hojas de *N. benthamiana* (Figura 12A). Para poder comprobar el organelo en el cual se encuentra ubicada esta proteína, se infiltró el constructo que posee el gen de interés junto un vector que posee un marcador conocido, que en este caso fue el vector ER-rk CD3-959, el cual posee un marcador de retículo endoplasmático ligado a mCherry (Figura 12B). Para optimizar la visualización de las imágenes, estas fueron captadas con un aumento de 20X más un aumento digital de 2X, en donde no se observa daño en las células epidermales (Figura 12C), por lo que se descarta la fluorescencia por daño mecánico.

La co-expresión mostró el solapamiento de la fluorescencia del marcador de retículo endoplasmático con la fluorescencia de la proteína GFP (Figura 12D), observándose un patrón en forma de red en el citoplasma. Lo que sugiere fuertemente que la acuaporina *PrucxmSIP1;2* estaría localizada en la membrana del retículo endoplasmático.

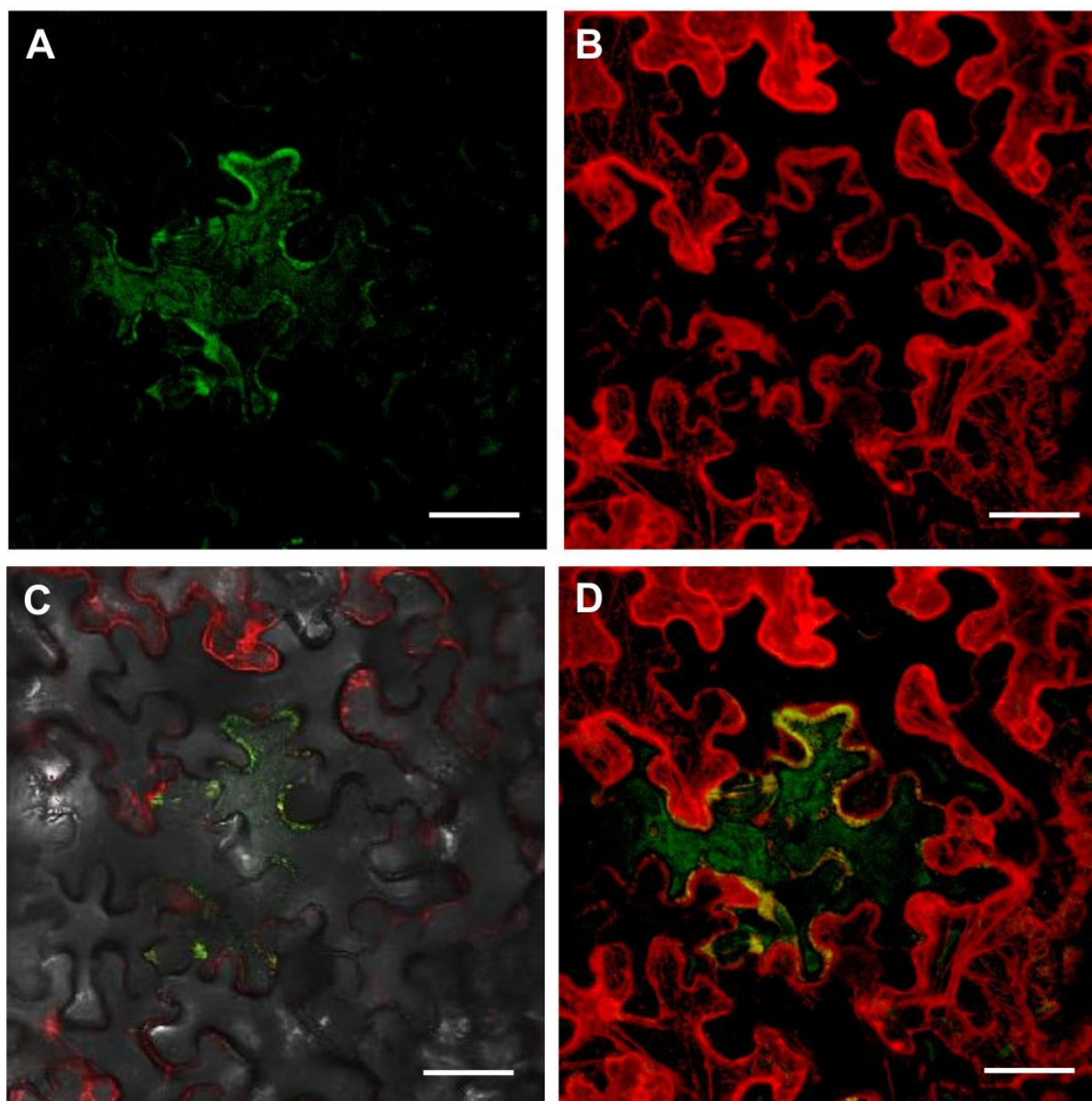


Figura 12. Localización subcelular de PrucxmSIP1;2 en *N. benthamiana*. Imágenes adquiridas luego de 72 horas de la infiltración, usando microscopio confocal con aumento 20X 2X. (A) Expresión del constructo PrucxmSIP1;2::GFP (B) Expresión del marcador de retículo ligado a mCherry (C) Imagen de campo claro (D) Co-localización de ambas señales de fluorescencia. Barra=50 μ m

Resultados objetivo 3: Evaluar la tolerancia de *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom que sobreexpresa el gen *PrucxmSIP1;2* al estrés por hipoxia radical.

Con el objetivo de entender el posible rol que puede estar cumpliendo la acuaporina *PrucxmSIP1;2* en la respuesta de tolerancia observada en el genotipo 'Mariana 2624', se generaron plantas transgénicas de *S. lycopersicum* cv. MicroTom. Se generaron dos líneas transgénicas (E1 y E2). Para corroborar la transformación génica de ambas líneas, se extrajo ADN de las plantas de la generación T0 y mediante PCR convencional se amplificaron las secuencias del gen de interés (*PrucxmSIP1;2*), higromicina y GFP para la selección de las plantas correctamente transformadas (Figura 13).



Figura 13. Muestras de ADN genómico de hojas de *S. lycopersicum*. Banda correspondiente a (A) GFP (B) Higromicina (C) Gen *PrucxmSIP1;2*. Los carriles 1-3 representan ADN total aislado de plantas WT, los carriles del 4 – 17 corresponden a muestras de plantas transgénicas E1 y los carriles 18 – 25 corresponden a muestras de plantas transgénicas E2 en los 3 geles. Se utilizó gel de agarosa al 1,5% y se tiñeron las muestras con GelRed, fue utilizado un marcador de peso molecular de 1kb.

Una vez que seleccionadas las plantas transgénicas de las líneas E1 y E2 por PCR convencional, se comprobó la expresión del gen *PrucxmSIP1;2* y su ortólogo en tomate cv. MicroTom por qPCR, en plantas generación T1. Primero se determinó la integridad del ARN extraído, en donde se observó claramente las bandas correspondientes a las subunidades del ribosoma 28S y 18S para todas las muestras, además se logró observar una tercera banda, menos nítida, la cual correspondería a la subunidad 5S (Figura 14).

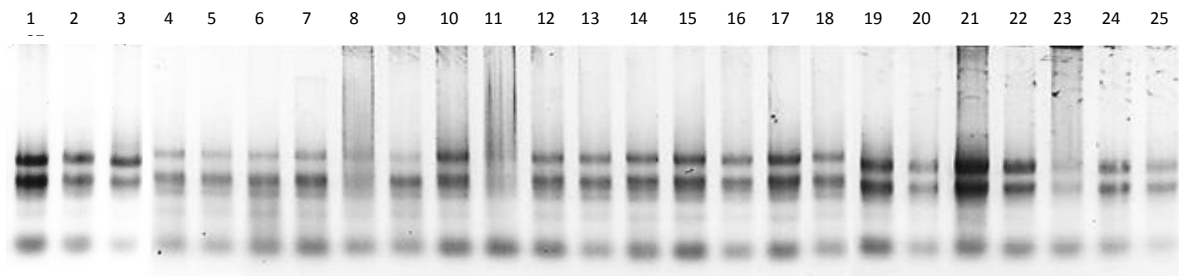


Figura 14. Muestras de ARN total de hojas de *S. lycopersicum*. Se observan tres bandas principales correspondientes a 28S, 18S y 5S. Los carriles 1 - 3 representan ARN total aislado de plantas WT, los carriles del 4 – 17 corresponden a muestras de plantas transgénicas E1 y los carriles 18 – 25 corresponden a muestras de plantas transgénicas E2. Se utilizó gel de agarosa al 1% y se tiñeron las muestras con GelRed.

Para verificar si efectivamente el gen de *Prunus* (*PrucxmSIP1;2*), se está expresando en la planta, se cuantificó mediante qPCR la expresión del gen en hojas de ambas líneas transgénicas. Se utilizó como control negativo plantas sin transformar (WT) de *S. lycopersicum*. También se analizó la expresión de la acuaporina ortóloga de tomate cv. MicroTom (*SISIP1;2*). Se puede observar que el gen candidato se expresa en ambas líneas transgénicas, sin observar diferencias en el nivel de expresión del gen de interés entre E1 y E2. Como se observa en la Figura 15, no se observa expresión del gen *PrucxmSIP1;2* en hojas de plantas WT corroborando el correcto proceso de transformación. La expresión del gen *SISIP1;2* muestra un patrón de expresión similar tanto en las plantas WT como en las plantas transgénicas (Figura 15).

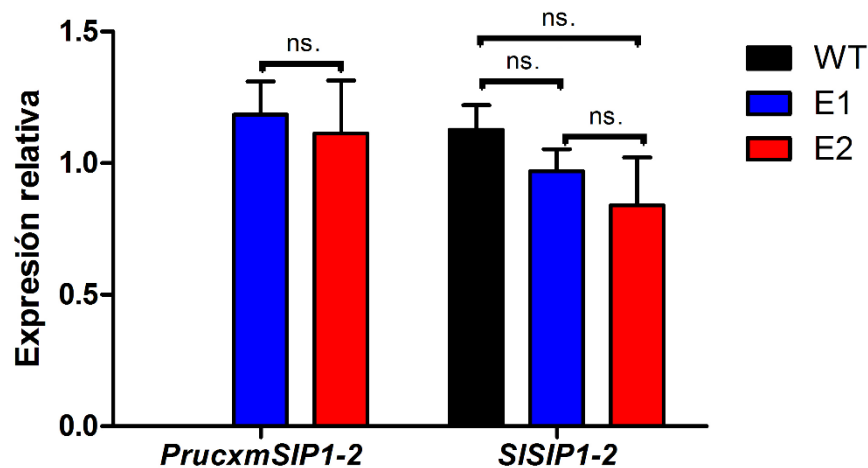


Figura 15. Expresión de *PrucxmSIP1;2* y *SISIP1;2* mediante qPCR. El análisis de qPCR se realizó usando ARN total de folíolos de *S. lycopersicum* de dos meses de edad. Para cuantificar la expresión relativa se utilizaron partidores específicos para los genes *PrucxmSIP1;2* y *SISIP1;1*. Los datos fueron normalizados con *TBP* (Espósito-Rodríguez *et al.*, 2008) como gen de expresión constitutiva. Las barras indican valores promedio de expresión relativa + error estándar de todas las plantas más dos repeticiones técnicas.

Posteriormente, y previo al tratamiento de inundación, se realizó la caracterización fenotípica de las líneas transgénicas (generación T1) comparándolas con las plantas WT. Los parámetros estudiados fueron: altura de planta, largo del foliolo y número de flores. Como se observa en la Tabla 6, las líneas transgénicas no presentan variaciones al compararlas con la línea WT en cuanto a largo de foliolo y número de flores. Sin embargo, se observan diferencias en altura de planta, donde la línea E2 tiene una altura similar a la planta WT, pero la línea E1 es 20% más pequeña que la línea E2 y WT (Tabla 6).

Tabla 6. Caracterización fenotípica de *S. lycopersicum* transformado con gen *PrucxmSIP1;2*. Se muestra la altura, el largo del foliolo y el número de flores de plantas WT y de las dos líneas transgénicas (E1 y E2)

	Altura (cm)	Largo foliolo (cm)	Nº Flores
WT	29,0 ± 0,6 b	6,0 ± 0,2 a	19,0 ± 1,0 a
E1	24,0 ± 0,1 a	5,8 ± 0,2 a	18,0 ± 0,2 a
E2	30,0 ± 0,4 b	5,9 ± 0,4 a	26,0 ± 0,9 b

La información se obtuvo del promedio de todas las plantas. Se utilizó test de Tukey ($p \leq 0.05$) y se compararon por característica anatómica medida.

Para determinar si la hipoxia interfiere en la reproducción de la planta, por lo que luego de 16 días de tratamiento de inundación, se analizó el número de frutos por planta y peso de ellos, tanto en plantas WT como en ambas líneas transgénicas. En las plantas WT el estrés por hipoxia afectó el número de frutos por planta, disminuyendo en un 50%. Sin embargo, las plantas de la línea transgénica E1 mantienen el número de frutos por planta pero el estrés por hipoxia afecta negativamente el peso de ellos. Por otro lado, en las plantas de la línea E2 se observó un aumento en el número de frutos por planta pero una disminución de su peso (Tabla 7).

Tabla 7. Caracterización de los frutos de *S. lycopersicum* sobreexpresantes del gen *PrucxmSIP1;2*. Se muestra el número de frutos y el peso de estos de plantas WT y de las dos líneas transgénicas (E1 y E2), en control y luego de 16 días de estrés por hipoxia.

	Número frutos		Peso fruto (g)	
	Control	Hipoxia	Control	Hipoxia
WT	7,0 ± 0,0 d	3,0 ± 0,2 ab	0,98 ± 0,03 b	1,76 ± 0,06 c
E1	6,0 ± 0,0 cd	5,0 ± 0,2 bc	1,89 ± 0,02 c	1,24 ± 0,02 b
E2	2,0 ± 0,4 a	5,0 ± 0,5 bc	0,92 ± 0,03 b	0,35 ± 0,01 a

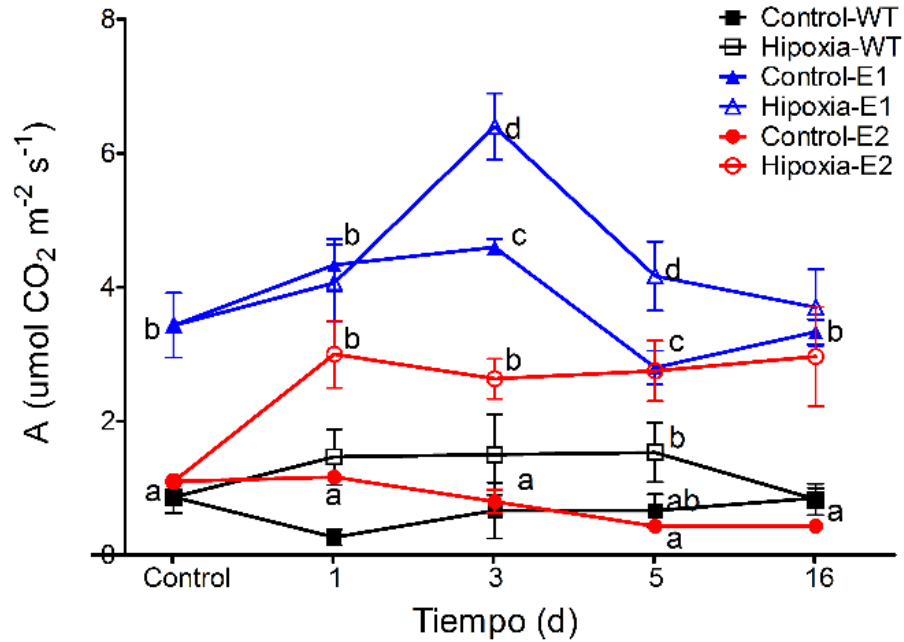
La información se obtuvo del promedio de todas las plantas. Se utilizó test de Tukey ($p \leq 0.05$) y se compararon por característica anatómica medida.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen *PrucxmSIP1;2* en plantas de tomate sometidos a hipoxia radical, se realizó una caracterización fisiológica que consistió en mediciones de intercambio gaseoso (fotosíntesis neta, conductancia estomática, transpiración y concentración interna de CO₂) y eficiencia en el uso del agua (EUA) durante el período de estrés en plantas WT y en las líneas transgénicas E1 y E2.

Unos de los primeros procesos que se afectan en las plantas cuando están sometidos a algún tipo de estrés es la fotosíntesis. Como se observa en la Figura 16A, la fotosíntesis presenta un patrón de respuesta a hipoxia significativamente diferente entre ambas líneas, E1 y E2. Las plantas de la línea E1 mostraron una fotosíntesis más alta en condición control como en hipoxia al compararlo con la línea E2 y WT. Es interesante notar que la fotosíntesis en condición control es mayor que en las plantas sin transformar. Junto con lo anterior, es igualmente interesante que la fotosíntesis aumente significativamente a los tres y cinco días de estrés por hipoxia (Figura 16A). Por otro lado, las plantas de la línea E2 tienen un comportamiento completamente diferente. Podemos observar que las plantas E2 en condición control no muestran diferencias significativas con las plantas sin transformar (WT) en control y también en hipoxia. Sin embargo, al someter las plantas a una deficiencia de oxígeno en las raíces, estas aumentan significativamente la fotosíntesis desde el día uno de tratamiento (Figura 16A).

El grado de apertura de los estomas o conductancia estomática es otro parámetro ampliamente usado para evaluar tolerancia o sensibilidad frente a un estrés. En las plantas de la línea E1 observamos diferencias significativas a los tres y cinco días de hipoxia al compararlas con las plantas de la línea E2 y WT en ambos tratamientos. Para las plantas E2 sólo observamos diferencias significativas a los 16 días de tratamiento, donde los estomas permanecen abiertos en las plantas sometidas a hipoxia radical (Figura 16B).

(A)



(B)

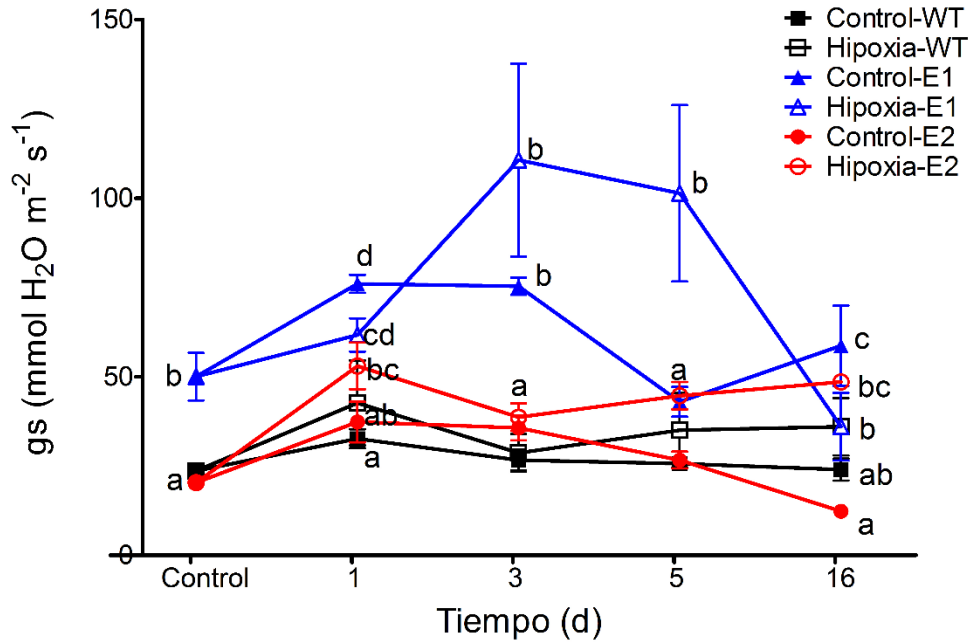


Figura 16. Efecto de la expresión de *PrucxmSIP1;2* en (a) fotosíntesis neta (A) y (b) conductancia estomática (gs). Estos parámetros fueron medidos a los 0, 1, 3, 5 y 16 días de tratamiento de hipoxia. Las letras muestran las diferencias significativas por tiempo de tratamiento, basado en el test de Fisher's LSD ($p \leq 0.05$).

En la Tabla 8 se muestran los valores de transpiración (T) y concentración interna de CO₂ (Ci). Al medir la tasa de transpiración que tenían las plantas de las líneas transgénicas, la línea E1 elimina el doble de agua a través de la transpiración que las plantas WT y E2. También se observó que las WT mantienen su transpiración al estar en hipoxia, en cambio la línea E1 aumenta a partir de los tres días de estar bajo estrés y luego disminuye drásticamente a los 16 días, llegando valores similares de transpiración que las plantas WT. En cambio la E2 empieza a aumentar su transpiración a los cinco días de inundación.

Tabla 8: Efecto de la expresión de *PrucxmSIP1;2* en la transpiración (E) y en la concentración interna de CO₂ (Ci). Medición realizada en plantas WT y en las dos líneas transgénicas (E1 y E2), en control y bajo estrés por hipoxia. Las mediciones se realizaron a los 0, 1, 3, 5 y 16 días de tratamiento.

E (mmol H₂O m⁻² s⁻¹)					
	0 días	1 día	3 días	5 días	16 días
WT control	0,63 ± 0,03a	0,87 ± 0,07 d	0,80 ± 0,06 a	0,73 ± 0,07 b	0,73 ± 0,09 ad
WT hipoxia	-	1,35 ± 0,12 bd	0,83 ± 0,12 a	0,70 ± 0,08 b	0,87 ± 0,26 ab
E1 control	1,23 ± 0,15b	1,87 ± 0,03 a	2,13 ± 0,07 b	1,27 ± 0,09 c	1,73 ± 0,30 c
E1 hipoxia	-	1,53 ± 0,13 ab	3,30 ± 0,16 c	2,70 ± 0,24 a	1,07 ± 0,23 ab
E2 control	0,53 ± 0,03a	0,97 ± 0,13 cd	1,00 ± 0,12 a	0,70 ± 0,06 b	0,37 ± 0,03 d
E2 hipoxia	-	1,33 ± 0,17 bc	1,07 ± 0,09 a	1,23 ± 0,13 c	1,03 ± 0,32 bc
Ci (ppm)					
	0 días	1 día	3 días	5 días	16 días
WT control	325 ± 11 a	368 ± 5 a	365 ± 1 a	320 ± 4 bc	328 ± 3 a
WT hipoxia	-	319 ± 16 cd	298 ± 7 ab	303 ± 9 b	327 ± 14 ab
E1 control	270 ± 10 b	284 ± 8 bc	274 ± 1 b	250 ± 1 a	276 ± 13 bc
E1 hipoxia	-	270 ± 9 b	307 ± 14 ab	316 ± 4 bc	193 ± 5 d
E2 control	309 ± 8 a	330 ± 4 d	337 ± 2 a	348 ± 3 c	321 ± 10 ab
E2 hipoxia	-	293 ± 14 cd	270 ± 18 b	283 ± 3 ab	256 ± 1 cd

Se observa datos de promedio ± el error relativo. Se utilizó test de Tukey como método estadístico (p ≤ 0.05) y se compararon por día de tratamiento (n=3).

Por otra parte, en condiciones control, la línea E2 no presenta diferencias con las plantas WT en la concentración interna de CO₂ (Ci), en cambio la línea E1 presenta un Ci menor. Al estar estresadas, las plantas WT mantienen su Ci, en cambio la línea E2 disminuye este parámetro significativamente. Por otro lado, la línea E1 aumentar su Ci a los cinco días, pero luego lo disminuye a los 16 días de tratamiento, llegando a ser menor que el Ci de la línea E2 en hipoxia (Tabla 8).

Al relacionar la fotosíntesis con la conductancia estomática, se puede observar que la línea E1 presenta una mayor eficiencia del uso del agua (EUA) en condición control que las plantas sin transformar y la línea E2 y. A pesar de esto ambas líneas transgénicas aumentan su eficiencia al estar en hipoxia, siendo la línea E2 la que presenta una mayor variación (Figura 17).

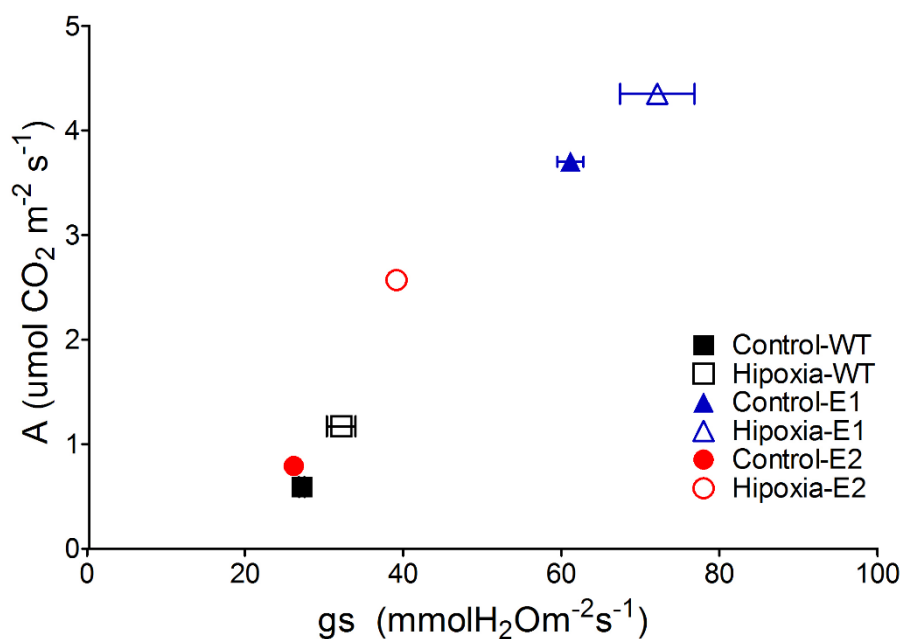


Figura 17. Cambios de la fotosíntesis neta (A) en función de la conductancia estomática (gs). Plantas control y bajo condiciones de hipoxia, resultados promedio de los datos obtenidos a los 0, 1, 3, 5 y 16 días de tratamiento por inundación.

La eficiencia en el uso del agua (EUA) nos permite evaluar la eficiencia en el uso del agua transpirada por mol de glucosa formado. En la figura 18 se puede observar que en condición control, previo al tratamiento de hipoxia, las líneas E1 y E2 son más eficientes que las plantas WT e incluso, la EUA es mayor al someter las plantas a hipoxia al día de tratamiento. Sin embargo, después del día cinco, observamos diferencias entre las líneas transgénicas y WT. Las plantas E1 muestran una mayor EUA sólo a los 16 días de hipoxia comparadas con plantas E1 bien regadas, plantas E2 control y plantas WT en ambas condiciones. A diferencia de las plantas de la línea E2, las cuales presentan un patrón interesante en cuanto a la EUA, como se observa en la figura 18, la EUA aumenta significativamente en condición de estrés para todos los tiempos estudiados, comparados con plantas bien regadas.

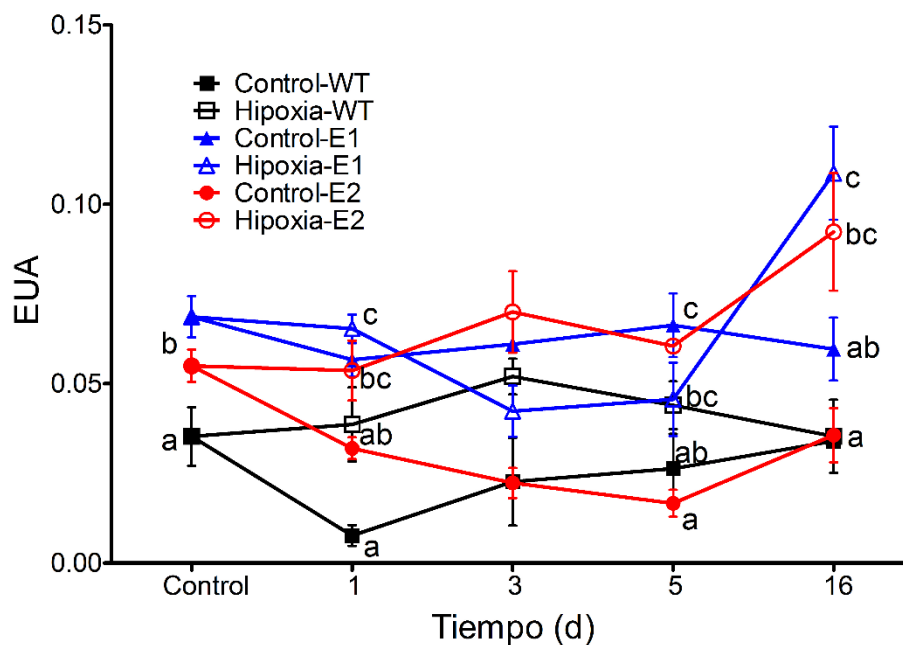


Figura 18. Efecto de la expresión de *PrucxmSIP1;2* en la eficiencia del uso del agua (EUA). Relación de fotosíntesis y conductancia estomática (A/gs) a los 0, 1, 3, 5 y 16 días de tratamiento por inundación. Las letras muestran las diferencias significativas por tiempo de tratamiento, basado en el test de Fisher's LSD ($p \leq 0.05$).

Dado que varios parámetros de intercambio gaseoso fueron afectados en las líneas transgénicas, se evaluó la morfología y número de estomas. Se observaron muestras de estomas de plantas en condición control para E1, E2 y WT mediante un microscopio de luz, pero no se aprecian diferencias en la forma ni en el tamaño de los estomas (Figura 19). Se determinó la densidad estomática de la superficie abaxial de folíolos de plantas WT y de ambas líneas transgénicas (E1 y E2) antes del tratamiento por inundación y después de este. Como se muestra en la Figura 20, las plantas WT poseen una densidad estomática de aproximadamente 200 n°estomas/mm² y estas no tuvieron alteraciones luego de estar inundadas. En contraste, las líneas transgénicas E1 y E2, manifestaron inicialmente una densidad estomática de 277 y 200 n°estomas/mm² respectivamente, pero la línea E2 aumento su densidad estomática en un 60% luego de haber estado 16 días inundadas (Figura 20).

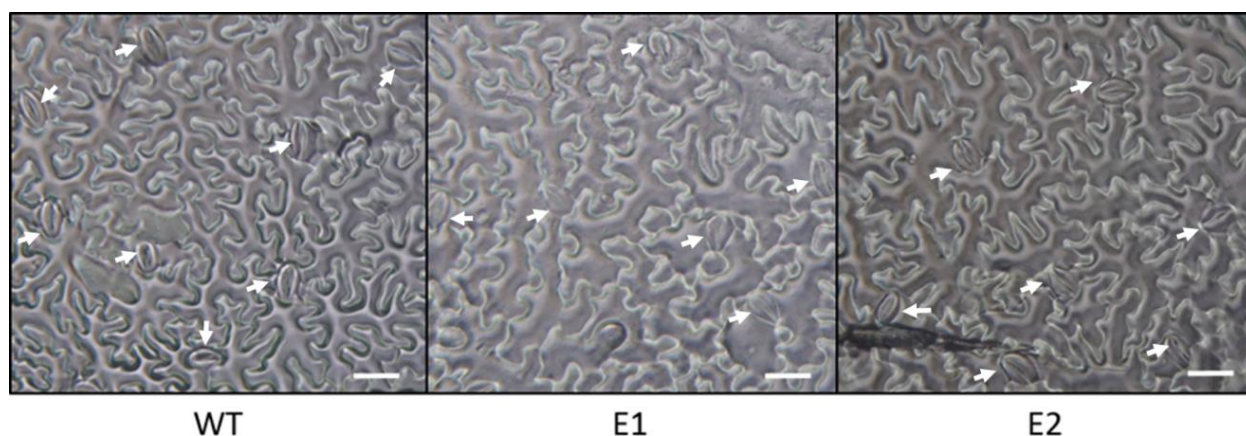


Figura 19. Estomas de plantas transformadas con el gen *PrucxmSIP1;2*. Imágenes de estomas (flechas blancas) obtenidas de la superficie abaxial de folíolos de plantas WT y de ambas líneas transgénicas (E1 y E2), en los 3 casos se muestran plantas control con aumento de 40X. Barra=50 μ m.

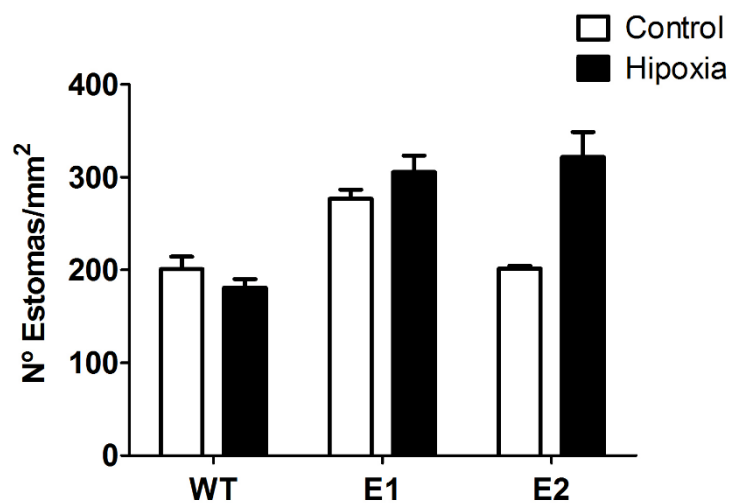


Figura 20. Efecto de la expresión de *PrucxmSIP1;2* en la densidad estomática. Densidad estomática de la cara abaxial de hojas de tomate cv. MicroTom WT y líneas transgénicas E1 y E2. Barra blanca son plantas control y en negro las plantas tratadas. Las letras muestran las diferencias significativas n = 8.

DISCUSIÓN

Caracterización bioinformática de acuaporinas de la subfamilia SIP

La familia de proteínas intrínsecas de membrana (MIP) tienen un importante rol en la célula, ya que se asocian al proceso de transporte pasivo de agua y otros solutos a través de la membrana celular, en dirección hacia un menor potencial hídrico, lo cual permite mantener la homeostasis celular y facilitar el metabolismo (Johansson *et al.*, 2000; Maurel *et al.*, 2015; Maurel *et al.*, 2009; Wudick *et al.*, 2009).

Las acuaporinas han sido descritas en distintas especies, tanto animal como vegetal, pero en plantas se han definido una mayor cantidad de subfamilias de acuaporinas que en otros seres vivos, ya que en mamíferos solo existen dos grupos, las acuaporinas que transportan agua y las que transportan glicerol (Verkman, 2008). En cambio en plantas superiores se han descrito cinco subfamilias (PIP, TIP, NIP, SIP y XIP), las cuales se diferencian por su localización dentro de la célula, debido a esto, cada subfamilia tiene variadas funciones y las han asociado con la respuesta que poseen las plantas a múltiples tipos de estrés (Cui *et al.*, 2008; Aroca *et al.*, 2012; Martínez-Ballesta y Carvajal, 2014; Reddy *et al.*, 2014). En el caso de estrés por hipoxia, estas proteínas de transmembrana son fundamentales, ya que permiten regular la pérdida de agua en la planta (Maurel *et al.*, 2015; Martínez-Ballesta *et al.*, 2011; Chaumont y Tyerman, 2014; Martínez-Ballesta y Carvajal, 2014; Reddy *et al.*, 2014).

Una de las últimas familias descubiertas son las SIPs (Johanson y Gustavsson, 2002), de las cuales existen pocos estudios y solo en uno de ellos las han relacionado con estrés abiótico (Reddy *et al.*, 2014). Este estudio fue realizado en acuaporinas de *Sorghum bicolor*, en el cual sometieron a las plantas a distintos tipos de estrés y se analizaron la expresión génica de todas las subfamilias de acuaporinas, en donde se demostró que la acuaporina *SbSIP1;2* se sobreexpresa en respuesta a estrés por baja temperatura (4 °C) y calor (40 °C), estrés salino y estrés hídrico (Reddy *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el portainjerto 'Mariana 2624' es tolerante y 'Mazzard F12/1' sensible a estrés por hipoxia radical (Pimentel *et al.*, 2014). Al analizar los niveles de transcritos de los genes *SIP*, se observaron diferentes perfiles de expresión en respuesta al estrés por hipoxia y es genotipo dependiente (ANEXO). En el caso del gen candidato *SIP1;2*, mostró un incremento en los niveles de transcritos en respuesta al estrés por hipoxia en el genotipo tolerante, 'Mariana 2624', y este aumento fue creciente mientras más tiempo las plantas permanecieron sometidas al estrés, mientras que el perfil transcripcional observado en el genotipo sensible, 'Mazzard F12/1', muestra un comportamiento opuesto, ya que expresión génica en raíces es reprimida al ser sometidas a hipoxia radical. En cuanto a la expresión órgano-específica del gen candidato, se puede observar que la expresión es mayor en raíces y flores en el genotipo tolerante (Ver sección Anexo).

De acuerdo a los escasos antecedentes encontrados en la literatura, en conjunto con los resultados generados por el grupo de Fisiología del Estrés, es interesante estudiar la subfamilia *SIP* para evaluar su posible rol en los procesos involucrados en la respuesta de tolerancia al estrés por hipoxia que se ha observado en portainjertos de *Prunus* spp.

Para analizar los motivos claves de las acuaporinas de la subfamilia *SIP* de 'Mariana 2624' y 'Mazzard F12/1', se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de *Prunus* junto con otras especies, de las cuales hay algunas secuencias ya caracterizadas como en *S. bicolor* (Reddy *et al.*, 2014) y en *V. vinifera* (Noronha *et al.*, 2014). Debido a los dos subgrupos detallados en estudios anteriores, se realizaron dos alineamientos de dichas secuencias aminoacídicas; uno para *SIP1* y otro para *SIP2*, (Johanson y Gustavsson, 2002; Ishikawa *et al.*, 2005; Noronha *et al.*, 2014). En donde se pueden observar los seis dominios de transmembrana, los motivos NPA y los cuatro residuos pertenecientes a la región ar/R (Figura 5). Estos dos últimos presentan variaciones en los aminoácidos que los componen por lo que se decidió analizar con mayor detalle.

Los motivos NPA se encuentran altamente conservados en las acuaporinas más estudiadas como las PIP (Ariani y Gepts, 2015), pero en el caso de la subfamilia SIP el motivo NPA, que está ubicado en el loop B, presenta variaciones. Dada la importancia de los residuos Asn-Pro-Ala (NPA) en la selección del sustrato, a través del enlace de hidrógeno entre una molécula de agua y el residuo de asparragina, la variación de este motivo puede caracterizar la especificidad del sustrato y/o la velocidad del transporte de agua (Maeshima y Ishikawa, 2008; Noronha *et al.*, 2014). Por lo que es probable que las SIP puedan mostrar una selectividad de transporte distinta a las otras acuaporinas (Ishikawa *et al.*, 2005; Maeshima y Ishikawa, 2008; Noronha *et al.*, 2014).

En la tabla 4 se pueden observar en detalle estos cambios, en el caso de *P. persica* y los genotipos contrastantes, la acuaporina SIP1 presenta una variación de un aminoácido apolar (alanina) a uno con características polares (treonina o serina). Este cambio podría otorgar a las SIP de este subgrupo una mayor afinidad por el agua facilitando su transporte. Esta variación ocurre en casi todas las especies analizadas, salvo en *P.trichocarpa* y en *S. lycopersicum*, en las cuales este motivo no presenta variaciones (NPA) (Tabla 4). El cambio a NPT/NPS también se ha observado en SIP1 de *Olea europaea*, *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum* y *Physcomitrella patens* (Noronha *et al.*, 2014; Ariani y Gepts, 2015; Deokar y Tar'an, 2016). Por otro lado, las SIP2 de todas las especies analizadas presentan una variación en la alanina por una leucina, aminoácido el cual también posee características apolares. En el caso de esta acuaporina, solo hay estudios en *P. vulgaris* y en *C. arietinum*, en donde se observa el cambio de NPA a NPL (Ariani y Gepts, 2015; Deokar y Tar'an, 2016). De acuerdo a los análisis realizados en este trabajo, más la información ya existente, se puede inferir que en el primer motivo NPA es diferente al de las otras acuaporinas, pero es conservado en las SIPs de todas las especies analizadas.

La región de constricción ar/R, es el principal filtro de selectividad que poseen las acuaporinas, por lo tanto los aminoácidos que la conforman son esenciales para poder dilucidar que sustratos pueden estar atravesando por el poro de la acuaporina. Al analizar esta región, se puede observar que SIP1 presenta los aminoácidos (A/T/F)-T-P-N en

todas las especies estudiadas y en el caso de SIP2 presenta los aminoácidos I-K-G-S (Tabla 4). Esta variación de aminoácidos entre los subgrupos puede influir en una variación en la eficiencia del transporte de agua o en la especificidad de transporte de algún soluto.

La información obtenida a partir del análisis de secuencias aminoacídicas, concuerda con estudios realizados en levadura transformada con el gen *VvSIP1* (Noronha *et al.*, 2014) y con *AtSIP1* (Ishikawa *et al.*, 2005), los cuales indican que dicha proteína produce un aumento en la permeabilidad de agua. Por otro lado, al comparar los motivos de la proteína de interés, PrucxmSIP1;2 y PruavSIP1;2, estas presentan los mismos aminoácidos en el motivo NPA y en la región ar/R, por lo que se puede sugerir que el comportamiento contrastante frente a estrés por hipoxia radical de ambos genotipos (ver sección anexo), no debiese cambiar la afinidad a algún sustrato específico.

Los arboles filogenéticos reportados hasta el momento de las acuaporinas SIP, relacionan hasta tres especies vegetales (Johanson y Gustavsson, 2002; Maeshima y Ishikawa, 2008; Ariani y Gepts, 2015; Maurel *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2015), por lo que se realizó un árbol filogenético más completo el cual relaciona las SIP pertenecientes a una mayor cantidad de especies (14 especies) tanto de plantas mono- como dicotiledóneas. Del alineamiento de secuencias aminoacídicas se generó un árbol filogenético, donde se pueden observar que las SIP se dividen en dos subgrupos (Figura 6). Esta información confirma los resultados de trabajos anteriores donde se identificaron claramente la división en dos grupos que fueron denominados SIP1 y SIP2 (Johanson y Gustavsson, 2002; Wallace y Roberts, 2004). Autores sugieren que la división en subgrupos que presentan las acuaporinas se habría producido antes de la divergencia entre mono- y dicotiledónea, esto queda demostrado en el árbol obtenido, debido a la agrupación que presentan las gramíneas (Ariani y Gepts, 2015; Maurel *et al.*, 2015).

La ubicación de las acuaporinas dentro de la célula vegetal va a determinar la función que esta tenga (Maurel *et al.*, 2015), por lo tanto se realizó una aproximación de la localización subcelular de la acuaporina de interés PrucxmSIP1;2. Para esto se realizó

un análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica, la cual reveló que presenta un péptido señal en el extremo N-terminal, el cual le permitiría a la proteína ser reconocida y posteriormente transportada a la membrana del retículo endoplasmático (Figura 7). También se pudo detectar que los extremos N- y C-terminal se ubican hacia el citoplasma, lo cual permite que la apertura del poro pueda ser regulada mediante fosforilación, metilación, entre otras (Maurel *et al.*, 2009; Chaumont y Tyerman, 2014). Se ha descrito que el extremo N-terminal de las SIP es más corto, comparado con el de otras acuaporinas de plantas (Johanson y Gustavsson, 2002). Esta variación en el largo de este extremo no debería influir en la regulación del poro, debido a que es posible que esta zona esté relacionada sólo con la localización subcelular (Maeshima y Ishikawa, 2008; Maurel *et al.*, 2009).

Como no se observan diferencias a nivel de secuencia aminoacídica (NPA y ar/R) entre ambos portainjertos, se estudió la región promotora de los genes *SIPs* de los genotipos contrastantes para poder encontrar alguna respuesta *in silico* de la diferencia de expresión génica que posee el gen de interés *PrucxmSIP1;2* con *PruavSIP1;2*. Estas variaciones en los niveles de expresión de los genes de la subfamilia SIP, se pueden deber a una regulación diferencial en la región promotora. Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron programas en donde las secuencias nucleotídicas de las regiones promotoras son comparadas con una base de datos de motivos (Mohanty *et al.*, 2005), en este estudio fueron analizadas 1000pb río arriba del inicio de la transcripción.

Para dicho análisis, se seleccionaron los motivos relacionados con anaerobiosis y con regulación hormonal, debido a que estas regulan la respuesta a varios estreses abióticos (Bailey-Serres y Voesenek, 2017). El motivo de respuesta a anaerobiosis (ARE) se encuentra presente en las tres isoformas, esto es debido a que dicho motivo es regulado de manera positiva para incrementar la expresión de ciertos genes durante la anaerobiosis (Walker *et al.*, 1987; Bailey-Serres y Voesenek, 2017). El gen *SIP1;1* de ambos portainjertos ('Mariana 2624' y 'Mazzard F12/1') presenta una mayor presencia de motivos relacionados con regulaciones hormonales que los genes de las otras acuaporinas analizadas. Una situación interesante se observa en la región promotora del

gen candidato *SIP1;2*, en donde el patrón de motivos encontrados cambia entre genotipos, en el caso del portainjerto sensible ('Mazzard F12/1') presenta el motivo CGTCA-box, el cual no se encuentra presente en la región promotora del genotipo tolerante ('Mariana 2624') (Figura 9). Este motivo está relacionado con la regulación de metil-jasmonato (MeJa) (Rouster *et al.*, 1997). El ácido jasmonico (JA) y el metil-jasmonato (MeJa) están relacionados con la división celular, el crecimiento de la planta, las actividades fotosintéticas y la inhibición de la apertura de estomas (Wang, 1999). Existe escasa información de la participación que posee MeJa en respuestas o regulación a estreses abióticos; en un estudio realizado en distintos genotipos de soya sometidos a estrés hídrico, se asperjaron plantas estresadas y plantas bien regadas con una solución con MeJa, y lo que se pudo observar es que las plantas mejoran su respuesta frente al estrés en comparación a las plantas estresadas sin MeJa (Mohamed y Latif, 2017). De la información obtenida del estudio de la región promotora nacen nuevas interrogantes relacionadas con la posible regulación de MeJa en la respuesta contrastante observada en los portainjertos en estudio.

Localización subcelular de la acuaporina PrucxmSIP1;2 en *N. benthamiana*

Conocer la localización subcelular de una proteína es importante ya que entrega indicios de cuál podría ser su función celular. En el caso de la subfamilia SIP, los pocos estudios que han caracterizado a estas acuaporinas, han descrito que se ubica en la membrana del retículo endoplasmático en *A. thaliana* y en *V. vinifera* (Ishikawa *et al.*, 2005; Noronha *et al.*, 2014) pero su función aún no está determinada.

De acuerdo con el análisis bioinformático de las secuencias, el análisis *in silico* del péptido señal sugiere localización en la membrana del retículo endoplasmático. Debido a que el péptido señal está ubicado en el extremo N-terminal, se utilizó el vector de destino pGWB505 (Nakagawa *et al.*, 2007), el cual nos permite realizar la generación del constructo *PrucxmSIP1;2::GFP*. Esto quiere decir que la proteína de marcaje (GFP) quedara en el extremo C-terminal de la proteína de interés al ser traducida, lo que nos

permite generar solo un constructo para observar la localización subcelular mediante microscopia, ya que la proteína de fluorescencia no va a interferir con la señalización para la correcta localización subcelular de la acuaporina (Ishikawa *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2007). Según los antecedentes anteriormente expuestos, se utilizó el vector ER-rk CD3-959, el cual contiene un promotor fuerte 35S y un marcador de organelo, que en este caso es un marcador de retículo endoplasmático (péptido señal) que va ligado a una proteína fluorescente roja (mCherry) (Nelson *et al.*, 2007). Con estos vectores se realizó la identificación de la localización subcelular de la acuaporina de estudio PrucxmSIP1;2 en hojas de tabaco.

Mediante la utilización de un microscopio de laser confocal (Olympus FV1000), se pudo determinar que la acuaporina PrucxmSIP1;2 está presente en el retículo endoplasmático (Figura 10). Este organelo es altamente diferenciado, pero a pesar de su diversidad morfológica, todas las membranas están unidas y constituyen una red de tubos que subyace en la membrana plasmática y recorre todo el citoplasma hasta el núcleo. Presenta un gran número de dominios estructurales, como el dominio de anclaje a la membrana plasmática, el de envoltura nuclear, los plasmodesmos, entre otros (Staehelin, 1997). Dentro de las principales funciones del retículo endoplasmático incluye la síntesis, procesamiento y clasificación de proteínas, glicoproteínas y lípidos, además de la regulación de los niveles de calcio citoplasmático (Staehelin, 1997).

Años antes al descubrimiento de la subfamilia SIP, ya se daban indicios de que el transporte de agua a través de los plasmodesmos, podía ser gracias a la acción de acuaporinas (Cantrill *et al.*, 1999). Los plasmodesmos son canales recubiertos de membrana plasmática, que poseen un conducto central llamado desmotúbulo. Este conducto, genera una red continua de retículo endoplasmático, permitiendo una conexión entre las células adyacentes, a través del movimiento de moléculas citoplasmáticas (Barton *et al.*, 2011). Durante un estrés, ya sea abiótico o por daño mecánico, existe un bloqueo de la vía citoplasmática del plasmodesmo, por lo tanto el desmotúbulo podría ser un canal importante para el transporte intercelular o de señalización por medio del retículo endoplasmático que sigue activo (Barton *et al.*, 2011).

Según estos datos, es interesante estudiar si estas acuaporinas solo regulan el paso de agua o permiten también el paso de otras moléculas. Esto podría explicar si el aumento de la expresión génica de *PrucxmSIP1;2* en estrés por hipoxia en el genotipo tolerante observado en estudios anteriores (Ver sección Anexo), tiene relación solo con la regulación de la homeostasis celular o con algún tipo de señalización.

Efecto de la sobreexpresión del gen *PrucxmSIP1;2* en *S. lycopersicum* cv. MicroTom sometido a estrés por hipoxia radical

Las acuaporinas hacen más eficiente el transporte de agua en la célula, sobre todo cuando la planta está bajo condiciones de estrés, ya que tienen la capacidad de controlar el flujo de agua a través de la membrana plasmática (Johansson *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2008). Dependiendo de la tolerancia de las especies, la deficiencia de oxígeno puede cerrar directa o indirectamente el poro que poseen las acuaporinas o alterar su abundancia, estos cambios pueden ser un componente clave en el transporte de agua a través de raíces anegadas (Bramley, 2006).

Para poder analizar la posible función que cumple la acuaporina *PrucxmSIP1;2*, se generaron plantas transgénicas de *S. lycopersicum* cv. MicroTom sobrepasando de manera constitutiva este gen de interés. Se obtuvieron dos líneas transgénicas (E1 y E2) las cuales expresan el gen de interés de 'Mariana 2624' (Figura 12).

La sobreexpresión constitutiva de un gen exógeno a la planta puede ocasionar cambios a nivel fenotípico (Zhang *et al.*, 2017), por lo que se analizaron fenotípicamente las plantas de ambas líneas transgénicas comparándolas con plantas sin transformar (Tabla 6). Se observaron diferencias entre ambas líneas a nivel de altura de las plantas, donde la línea transgénica E1 es más pequeña que la línea E2 y que las plantas WT. Luego del tratamiento de inundación, la línea E2 presento más frutos que la línea E1 y que las plantas sin transformar, las cuales disminuye el número de sus frutos. Dichas variaciones pueden ser consecuencia de una diferencia en el perfil hormonal de las

plantas transgénicas. Zhang et al., (2017) sugieren que el menor tamaño de las líneas transgénicas que sobreexpresan el gen GmSIP1;3 en comparación con las WT, se debería a un incremento en los niveles de auxina y a una disminución de ácido abscísico en hojas.

El estrés por hipoxia radical, altera procesos en la planta los cuales inducen cambios fisiológicos, tales como cierre estomático y la reducción de la tasa fotosintética (Mielke *et al.*, 2003). Una de las primeras respuestas fisiológicas de las plantas bajo estrés por hipoxia radical, es la disminución de la fotosíntesis, esto debido al cierre estomático, disminución de la permeabilidad de raíces y a la disminución de la concentración de clorofila (Pérez-Jiménez *et al.*, 2017; Pimentel *et al.*, 2014).

En el presente estudio, se midieron parámetros de intercambio gaseoso en hojas de plantas de tomate cv. MicroTom transformadas con el gen de interés (*PrucxmSIP1;2*), para determinar los efectos del estrés por hipoxia sobre la conductancia estomática y capacidad fotosintética foliar. La reducción de la conductancia estomática y de la fotosíntesis neta en plantas inundadas se interpreta como un mecanismo para limitar la pérdida de agua, pero en plantas tolerantes a estrés por hipoxia se ha reportado que ambos parámetros no cambian (Else *et al.*, 1996; Pimentel *et al.*, 2014). En el caso de las líneas transgénicas, ambas presentan una fotosíntesis neta más alta en condiciones de hipoxia que las plantas no transformadas (Figura 14).

Bradford en 1983, analizó el comportamiento de plantas de *S. lycopersicum* frente a estrés por hipoxia, en donde se indica que el cierre estomático se genera para prevenir un evento de déficit hídrico foliar. Estos resultados sugieren que las raíces estresadas estarían implicadas en la alteración del comportamiento estomático, provocando el cierre estomático sin afectar la capacidad fotosintética de la planta, en cuyo caso se reduciría la concentración interna de CO₂ (Ci). Esta respuesta, la observamos en la línea E2 al estar sometida a estrés por hipoxia, la cual disminuye Ci significativamente (Tabla 8) pero mantiene alta la fotosíntesis neta (Figura 14). Esto se puede inferir debido a que la correlación observada entre la conductancia estomática y la capacidad fotosintética no

se debe a los efectos de la fotosíntesis sobre la conductancia (Bradford, 1983). Esta información se relaciona con la obtenida en la figura 14, en donde la línea E2 al estar sometida a estrés por hipoxia aumentan la fotosíntesis sin tener mayores variaciones en la conductancia estomática, en cambio la línea E1 y la WT no presentan una mayor variación entre la planta control y la sometida a hipoxia (Figura 14).

Para que una planta pueda tolerar de mejor manera un estrés, debe utilizar de forma eficiente el agua. La eficiencia del uso del agua (EUA) es la cantidad de mmoles de CO₂ captado por la planta por mmoles de H₂O transpirados (Medrano *et al.*, 2009). Según esto, una alta EUA se considera generalmente una característica adaptativa importante en condiciones de estrés hídrico (Xu *et al.*, 2008). Este parámetro, también es relevante cuando hay deficiencia de oxígeno durante la inundación del suelo, lo cual reduce la permeabilidad de la membrana de las raíces, limitando la absorción de agua (Medrano *et al.*, 2009).

Toda la información obtenida de los parámetros de intercambio gaseoso, se termina relacionando con la EUA, en donde ambas líneas aumentan su EUA en estrés por hipoxia (Figura 15 y 16). McLeod *et al.* (1986), realizó un estudio en especies de bosque pantanoso, en el cual las plantas fueron expuestas a estrés por hipoxia radical. Según sus resultados logro demostrar que un alto valor de EUA puede explicar, en cierta medida, la tolerancia relativa de esta especie a hipoxia radical, debido a que la conductancia radical de la planta se encuentra disminuida.

Los estomas regulan el intercambio de CO₂ y el vapor de agua entre la hoja y la atmósfera (Bailey-Serres y Voesenek, 2017; Mielke *et al.*, 2003). La formación de estomas puede verse afectada por la humedad ambiental, la luz, el contenido de humedad del suelo, la temperatura o el CO₂ atmosférico (Xu *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2013;). En nuestro estudio las plantas de la línea E2, presentan un aumento del 60% en su densidad estomática al encontrarse en un estado de estrés por hipoxia, en comparación con las plantas control (Figura 18). Esto puede estar relacionado con el aumento en la

conductancia estomática que tiene esta línea transgénica a los 16 días de tratamiento (Figura 14).

Junto con la información anteriormente dada, estos resultados indican que ambas líneas transgénicas presentan una mejor tolerancia a hipoxia radical que las plantas WT. Pero también da indicios de que la línea E2 ocupa un mecanismo diferente al de las plantas tolerantes a hipoxia, ya que aumenta el intercambio gaseoso, sin perjudicar a la planta. Esto puede deberse a que la planta no disminuye su conductividad hidráulica, para determinar si esto es correcto, es necesario realizar mayores análisis.

CONCLUSIONES

Se identificaron tres isoformas de acuaporinas SIP en *Prunus* spp. (SIP1;1, SIP1;2 y SIP2). Según datos anteriormente obtenidos, *SIP1;2* era de mayor interés por mostrar un perfil de expresión génica diferenciado entre el genotipo tolerante ('Mariana 2624') y el genotipo sensible ('Mazzard F12/1') frente a estrés por hipoxia.

Se identificó en la región promotora del gen de interés (*PrucxmSIP1;2*) un menor número de motivos de regulación hormonal y se diferencia del genotipo sensible por la falta de un motivo relacionado con MeJa.

Estos resultados, junto con la ubicación de dicha acuaporina en el retículo endoplasmático y posiblemente en el plasmodesmo, serían importantes para la posible respuesta de la planta al estrés.

Fisiológicamente la acuaporina *PrucxmSIP1;2* estaría mejorando la respuesta de las plantas frente a estrés por hipoxia. Interesante es la E2, la cual muestra una mejor respuesta frente a estrés por hipoxia, ya que en condiciones normales se comporta de manera similar que las plantas WT, pero al ser sometida al estrés por hipoxia esta aumenta su fotosíntesis y su densidad estomática, repercutiendo de manera positiva en su EUA.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que la sobreexpresión del gen de interés *PrucxmSIP1;2*, estaría confiriendo a las plantas de tomate cv. MicroTom, tolerancia frente a un estrés por hipoxia, de esta manera estaríamos aprobando la hipótesis realizada.

PROYECCIONES

Análisis regulación hormonal:

Evaluar expresión de gen *SIP1;2* en genotipos de portainjertos contrastantes ('Mariana 2624' y 'Mazzard F12/1') con tratamiento de MeJa en estrés por hipoxia.

Análisis de transporte:

Transformación de levaduras con gen *PrucxmSIP1;2* y *PruavSIP1;2*, para determinar mediante espectrofotometría de flujo detenido, si dichas acuaporinas transportan agua o algún soluto.

Análisis fisiológico:

Análisis en mayor profundidad, con cuatro líneas transgénicas de generación T2, a las cuales se les determinara:

- número de copias del gen, para evaluar si las diferencias en la respuesta de las líneas podría deberse a eso.
- Medición de parámetros de intercambio gaseoso (A , g_s , E y C_i)
- Medición de nuevos parámetros: Biomasa, conductancia radical, área foliar específica, entre otros.

ANEXO 1

Trabajo previo

Análisis de expresión génica de genes *SIPs* en portainjertos de *Prunus* spp. con respuesta contrastante al estrés por hipoxia: análisis en órganos de Mariana 2624 y análisis del patrón de expresión en raíces sometidas a hipoxia.

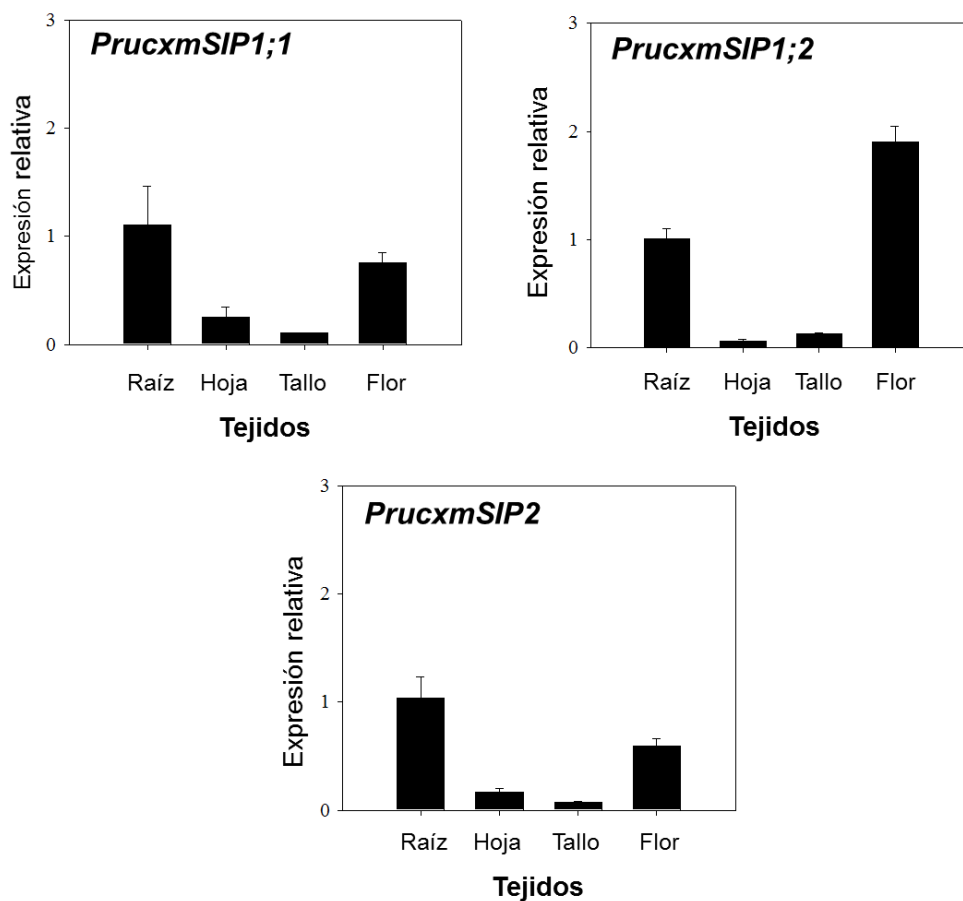


Figura A1. Niveles de expresión de genes *SIPs* en órganos de Mariana 2624. Los análisis de expresión génica fueron examinados por qPCR usando RNA total de raíces, hojas, tallos y flores. Las barras indican valores promedio de expresión relativa +/- error estándar (n = 6), normalizados con *TEF2* como gen de expresión constitutiva.

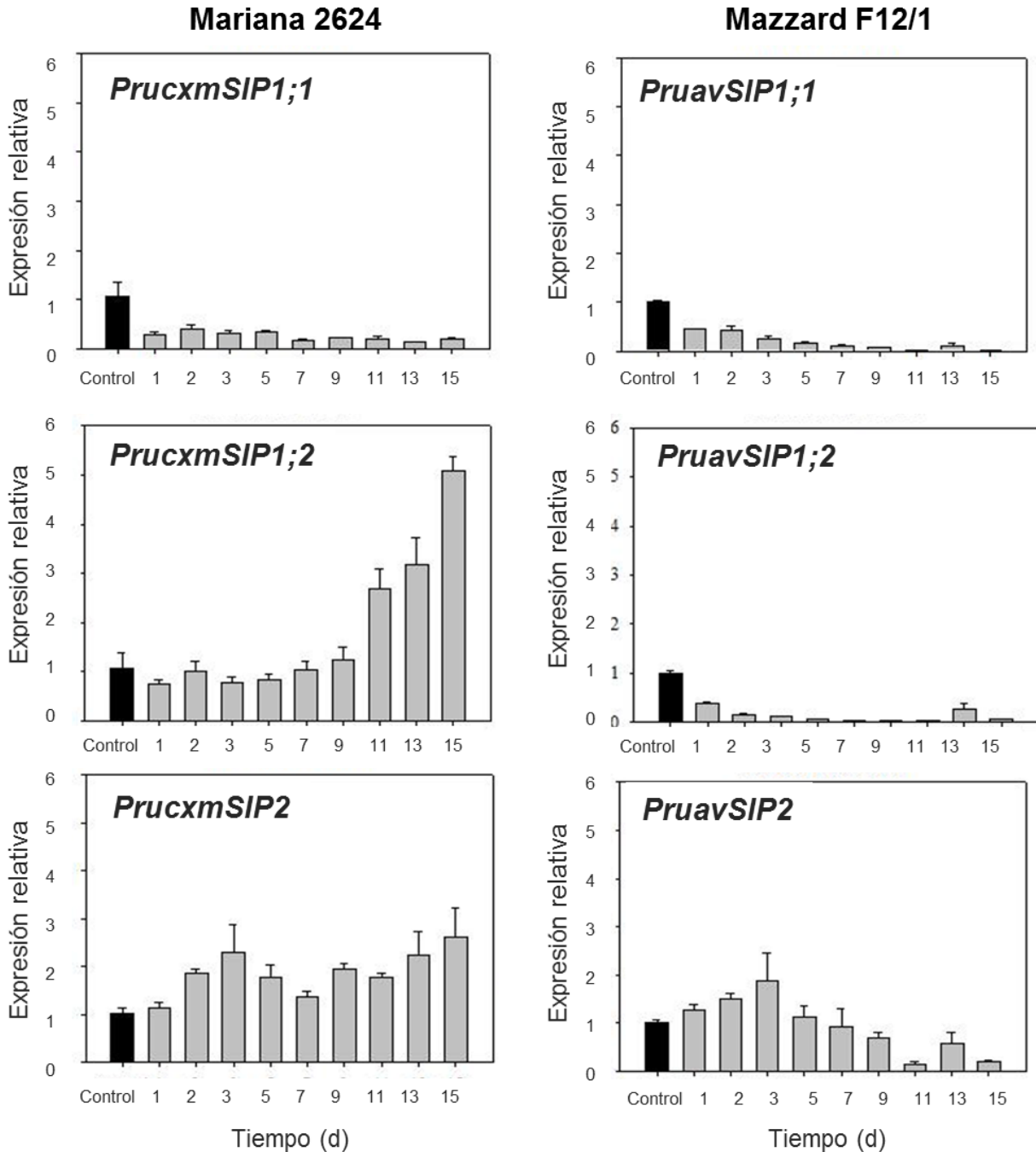


Figura A2. Nivel de expresión de SIPs en raíces de portainjertos de *Prunus* spp. con respuesta al estrés por hipoxia. Los análisis de expresión génica realizados por qPCR usando RNA total de raíces en muestras control (barra negra) y después del tratamiento de inundación a los 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 d (barras grises). Las barras indican valores promedio de expresión relativa \pm error estándar ($n = 6$), normalizados con *TEF2* como gen de expresión constitutiva.

ANEXO 2

Tabla resumen: Resumen de resultados obtenidos en la caracterización de plantas transgénicas con gen *PrucxmSIP1;2*

		Altura	Nº flores	Nº frutos	A	gs	E	Ci	EUA	D.E.	
Día 0	Control	WT	29 b	19 a	-	0,87 a	23 a	0,63 a	325 a	0,03 a	-
		E1	24 a	18 a	-	3,43 b	20 a	1,23 b	270 b	0,07 b	-
		E2	30 b	26 b	-	1,10 a	50 b	0,53 a	309 a	0,06 b	-
Día 1	Control	WT	-	-	-	0,26 a	32 a	0,87 d	368 a	0,01 a	-
		E1	-	-	-	4,33 b	76 d	1,87 a	284 bc	0,06 bc	-
		E2	-	-	-	1,17 a	37 ab	0,97cd	330 d	0,03 a	-
	Hipoxia	WT	-	-	-	1,46 a	43 abc	1,35bd	319 cd	0,04 ab	-
		E1	-	-	-	4,06 b	62 cd	1,53ab	270 b	0,07 c	-
		E2	-	-	-	3,00 b	53 bc	1,33bc	293 cd	0,05 bc	-
Día 3	Control	WT	-	-	-	0,66 a	26 a	0,80 a	365 a	0,02 a	-
		E1	-	-	-	4,60 c	75 b	2,13 b	274 b	0,06 b	-
		E2	-	-	-	0,80 a	35 a	1,00 a	337 a	0,02 a	-
	Hipoxia	WT	-	-	-	1,50 a	28 a	0,83 a	298 ab	0,05 b	-
		E1	-	-	-	6,40 d	110 b	3,30 c	307 ab	0,04ab	-
		E2	-	-	-	2,63 b	38 a	1,07 a	270 b	0,07 b	-
Día 5	Control	WT	-	-	-	0,66ab	25 a	0,73 b	320 bc	0,03 ab	-
		E1	-	-	-	2,80 c	43 a	1,27 c	250 a	0,04 bc	-
		E2	-	-	-	0,43 a	26 a	0,70 b	348 c	0,02 a	-
	Hipoxia	WT	-	-	-	1,53 b	35 a	0,70 b	303 b	0,04 bc	-
		E1	-	-	-	4,16 d	101 b	2,70 a	316 bc	0,07 c	-
		E2	-	-	-	2,75 c	44 a	1,23 c	283 ab	0,06 c	-
Día 16	Control	WT	-	-	7 d	0,83 a	24 ab	0,73ad	328 a	0,03 a	200 a
		E1	-	-	6 cd	3,33 b	58 c	1,73 c	276 bc	0,06 ab	277 b
		E2	-	-	2 a	0,43 a	12 a	0,37 d	321 ab	0,04 a	202 a
	Hipoxia	WT	-	-	3 ab	0,85 a	36 b	0,87ab	327 ab	0,04 a	181 a
		E1	-	-	5 bc	3,70 b	36 b	1,07ab	193 d	0,11 c	306 b
		E2	-	-	5 bc	2,97 b	48 bc	1,03bc	256 cd	0,09 bc	322 b

REFERENCIAS

- Ariani, A. and Gepts P. (2015) Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 209 (5)
- Aroca, R., Porcel, R. and, Ruiz-Lozano, J.M. (2012) Regulation of root water uptake under abiotic stress condition. *Journal of Experimental Botany* 63: 43-57.
- Bai, T., Li, C., Li, C., Liang, D. and Ma, F. (2013) Contrasting hypoxia tolerance and adaptation in *Malus* species is linked to differences in stomatal behavior and photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 147: 514-523.
- Bailey-Serres, J. and Voesenek, L. (2008) Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annuals Review of Plant Biology* 59: 313-319.
- Barton, D.A., Cole, L., Collings, D.A., Liu, D.Y., Smith, P.M., Day, D.A. and Overall, R.L. (2011). Cell-to-cell transport via the lumen of the endoplasmic reticulum. *The Plant Journal* 66: 806-817
- Bradford, K.J. (1983) Involvement of plant growth substances in the alteration of leaf gas exchange of flooded tomato plants. *Plant physiology* 73: 480-483
- Bramley, H. (2006) Root structure, aquaporin activity and waterlogging (Doctoral thesis). School of plant biology, The University of Western Australia
- Cantrill, L.C., Overall, R.L. and Goodwin, P.B. (1999) Cell-to-Cell communication via plant endomembranes. *Cell Biology International* 23: 653-661
- Chaumont, F. and Tyerman, S. (2014) Aquaporins: Highly regulated channels controlling plants water relations. *Plant Physiology*, 164: 1600-1618.

Cui, X.H., Hao, F.S., Chen, H., Chen, J. and Wang, X.C. (2008) Expression of the *Vicia faba* VfPIP1 gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance, Journal of Plant Research 121: 207-214.

Dennis, E.S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F.U., Grover, A., Ismond, K.P., Good, A.G. and Peacock, W.J. (2000) Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. Journal of Experimental Botany, 51: 89-97.

Deokar, A. and Tar'an, B. (2016) Genome-Wide Analysis of the Aquaporin Gene Family in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Frontiers in plant science, 7: 1802

Ellis, M.H. and Setter, T.L. (1999) Hypoxia Induces Anoxia Tolerance in completely Submerged Rice Seedlings. Journal of plant physiology 154: 219-230

Else, M., Tiekstra, A., Croker, S., Davies, W. and Jackson, M. (1996) Stomatal Closure in Flooded Tomato Plants Involves Absciscic Acid and a Chemically Unidentified Anti-Transpirant in Xylem Sap, Plant Physiology 112: 239-247

Espósito-Rodríguez, M., Borges, A., Borges-Pérez, A. and Pérez, J.A. (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. BMC Plant Biology 8:131

FAO (2006). FAO Statistical Yearbook 2005-2006 Food and Agriculture Organization 367.

Fetter, K., Wilder, V.V., Moshelion, M. and Chaumont, F. (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. Plant Cell 16: 215–228.

Gainza, F., Opazo, I., Guajardo, V., Meza, P., Ortiz, M., Pinochet, J. and Muñoz, C. (2015) Rootstock breeding in *Prunus* species: Ongoing efforts and new challenges. *Chilean Journal of Agricultural research* 75: 6-16.

Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M. and Maeshima, M. (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 579: 5814-5820.

Maeshima, M. and Ishikawa, F. (2008). ER membrane aquaporins in plants. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 456: 709-716

Jiménez, J., Pinochet, J., Gogorcena, Y., Betran, J.A. and Moreno, M.A. (2007) Influence of different vigour cherry rootstocks on leaves and shoot mineral composition. *Scientia Horticulturae* 112: 73-79.

Johanson, U. and Gustavsson, S. (2002) A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution* 19: 456–461.

Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. and Kjellbom, P. (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 324-342.

Kato-Noguchi, H. and Morokuma, M. (2007) Ethanol fermentation and anoxia tolerance in four rice cultivars. *Journal of Plant Physiology* 164: 168-173

Laur, J. and Hacke, U. (2014) The role of water channel proteins in facilitating recovery of leaf hydraulic conductance from water stress in *Populus trichocarpa*. *Plos One* 9 (11).

Maeshima, M. and Ishikawa, F. (2008) ER membrane aquaporins in plants. *European Journal of Physiology* 456:709-716

Martinez-Ballesta, M.C. and Carvajal, M. (2014) New challenges in plant aquaporin biotechnology. *Plant Science* 71-77.

Martinez-Ballesta, M.C., Rodriguez-Hernandez, M.C., Alcaraz-Lopez, C., Mota-Cadenas, C., Muries, B. and Carvajal, M. (2011) Plant hydraulic conductivity: The acuaporins contribution. En: Elango, L. (ed) *Hydraulic conductivity – Issues, determination and applications*: 103-122. INTECH.

Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D., Santoni, V., Shahzad, Z and Verdoucq, L. (2015) Aquaporins in plants. *Physiological Reviews* 95: 1321-1358.

Maurel, C., Santoni, V., Luu, D., Wudick M.M. and Verdoucq, L. (2009) The cellular dynamics of plant aquaporin expression and fuctions. *Current opinion in Plant Biology* 12: 690-698.

McLeod, K., Donovan, L., Stumpff, N. and Sherrod, K.C. (1986) Biomass, photosynthesis and water use efficiency of woody swamp species subjected to flooding and elevated water temperature. *Tree Physiology* 2: 341-346

Medrano, H., Flexas, J. and Galmés, J. (2009) Variability in water use efficiency at the leaf level among Mediterranean plants with different growth forms. *Plant Soil* 317: 17-29

Mielke, M., Almeida, A., Gomes, F., Aguilar. MA., Mangabeira, PA. (2003) Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. *Environmental and experimental Botany* 50: 221-231

Mohanty, B., Krishnan, S.P.T., Swarup, S. and Bajic, V. (2005) Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. *Annals of botany* 96: 669-681.

Mohamed, H. and Latif, H. (2017) Improvement of drought tolerance of soybean plants by using methyl jasmonate

Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., Tabata, R., Kawai, T., Tanaka, K., Niwa, Y., Watanabe, Y., Nakamura, K., Kimura, T. and Ishiguro, S. (2007). Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 71 (8): 2095-2100.

Nelson, B.K., Cai, X. and Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal* 51: 1126-1136

Noronha, H., Agasse, A., Martins, A.P., Berny, M.C., Gomes, D., Zarrouk, O., Thiebaud, P., Delrot, S., Soveral, G., Chaumont, F. and Gerós, H. (2014) The grape aquaporin VvSIP1 transports water across the ER membrane. *Journal of Experimental Botany* 65: 981-993.

Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA) (2014) <http://www.odepa.cl/superficie-de-frutales-por-region->

Pérez-Jiménez, M., Hernández-Munuera, M., Piñero, M., López-Ortega, G. and del Amor, F. (2017) CO₂ effects on the waterlogging response of ‘Gisela 5’ and ‘Gisela 6’ (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) sweet cherry (*Prunus avium*) rootstocks. *Journal of Plant Physiology* 213: 178-187

Pimentel, P., Almada, R., Salvatierra, A., Toro, G., Arismendi, M.J., Pino, M.T., Sagredo, B. and Pinto, M. (2014). Physiological and morphological responses of *Prunus* species with different degree of tolerance to long-term root hypoxia. *Scientia Horticulturae* 180: 14–23.

Pinochet, J. (2010) 'Replantac' (Rootpac R), a plum-almond hybrid rootstock for replant situations. HortScience 45: 299-301.

Pistelli, L., Iacona, C., Miano, D., Cirilli, M., Colao, M., Mensuali-Sodi, A. and Muleo, R. (2012). Novel *Prunus* rootstock somaclonal variants with divergent ability to tolerate waterlogging. Tree Physiology 32: 355-368.

Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A. and Campbell, C.S. (2007) Phylogeny and classification of *Rosaceae*. Plant Systematics and Evolution, 266: 5-43.

PROCISUR (2010). El riego en los países del Cono Sur. Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 112 p.

Reddy P.S., Rao T.S.R.B., Sharma K.K. and Vadez V. (2014) Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.) Plant Gene. 1: 18-28.

Rouster, J., Leah, R., Mundy, J. and Cameron-Mills, V. (1997). Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. The Plant Journal 11(3): 513-523

Staehelin, L.A. (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. The Plant Journal 11(6):1151-1165

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and evolution 28: 2731-2739.

Törnroth-Horsefield, S., Hedfalk, K., Fischer, G., Lindkvist-Petersson, K., Neutze R. (2010) Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *FEBS Letters* 584: 2580-2588

Verkman, A. S. (2008). Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance. *Expert reviews in molecular medicine*, 10, e13.

Verma, R., Prabh, N. and Sankararamakrishnan R. (2014) New subfamilies of major intrinsic proteins in fungi suggest novel transport properties in fungal channels: implications for the host-fungal interactions. *BMC evolutionary Biology* 14:173

Walker, J., Howard, E., Dennis, E. and Peacock. W. (1987) DNA sequences required for anaerobic expression of the maize alcohol dehydrogenase 1 gene. *PNAS* 84: 6624-6628.

Wallace, I. and Roberts, D. (2004) Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiology* 135: 1059-1068.

Wudick M.M., Luu D.T. and Maurel C. (2009) A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist* 184: 289–302.

Xu, Y., Hu, W., Liu, J., Zhang, J., Jia, C., Miao, H., Xu, B. and Jin, Z. (2014) A banana aquaporin gen, MaPIP1;1, is involved in tolerance to drought and salt stresses. *BMC plant biology* 14:59.

Xu, Z. and Zhou, G. (2008) Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany* 59 (12): 3317–3325

Zhang, D., Huang, Y., Kumar, M., Wan, Q., Xu, Z., Shao, H. and Pandey, G. (2017) Heterologous expression of GmSIP1;3 from soybean in tobacco showed growth retardation and tolerance to hydrogen peroxide. *Plant Science*